UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PROTEINE DES PEPTIDYLTRANSFERASE-ZENTRUMS IN ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Hampl
aus Berlin

1976

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PROTEINE DES EPTIDYLTRANSFERASE-ZENTRUMS N ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Hampl
aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent : Prof. Dr. H.-G. Wittmann

2. Referent : Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der Promotion 15. Dezember 1976

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Erklärung der Abkürzungen	5
2.2	Material	5
2.2.1	Proteine und RNA	5
2.2.2	Chemikalien	6
2.2.3	Puffer	7
2.2.4	Gele, Färbe- und Entfärbelösungen	7
2.3	Isolierung von Ribosomen und core-Partikeln	9
2.3.1	Fermentation von Escherichia coli K12, Stamm A19	9
2.3.2	Präparation von 50S Untereinheiten	10
2.3.3	Herstellung von core-Partikeln und split-Proteinen durch LiCl-Behandlung	11
2.4	Isolierung und Identifizierung ribosomaler Proteine	11
2.4.1	Essigsäureextraktion von Proteinen aus 50S Untereinheiten oder core-Partikeln	11
2.4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	12
2.4.3	Proteinisolierung über Sephadex G100-Säulen	14
2.5	Isolierung und Identifizierung ribosomaler RNA	15
2.5.1	RNA Präparation durch Phenolisierung	15
2.5.2	Trennung von 23S und 5S RNA	16
2.5.3	SDS-Gelelektrophorese	18

		Seite
2.6	Herstellung des tRNA Fragments C-A-C-C-A-(^{3}H)Leu-Ac	19
2.6.1	Beladung der tRNA	19
2.6.2	Extraktion der beladenen tRNA	19
2.6.3	T_1-Verdauung	20
2.6.4	Erste Elektrophorese	20
2.6.5	Zweite Elektrophorese	21
2.7	Rekonstitution und Funktionsteste	21
2.7.1	Partielle Rekonstitution von 50S Untereinheiten	21
2.7.2	Totale Rekonstitution von 50S Untereinheiten	22
2.7.3	Fragment-Reaktion	22
2.7.4	Poly(U) abhängige Poly(Phe)-Synthese	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Experimenteller Ausgangspunkt für die Rekonstitution des Peptidyltransferase-Zentrums	25
3.2	Optimierung der Isolierung von core-Partikeln und split-Proteinen	27
3.3	Erste Identifizierung der wesentlichen Proteine der SP1.6 split-Proteine mit dem 1.2c core	31
3.4	Rekonstitution des Peptidyltransferase-Zentrums auf dem 4.0c core mit SP1.3 Proteinen	33
3.5	Eine Partikel von Bacillus stearothermophilus 50S Ribosomen mit Peptidyltransferase-Aktivität	44

		Seite
3.6	Totale Rekonstitution des Peptidyltransferase-Zentrums	47
3.6.1	Identifikation der wesentlichen Proteine des E. coli 4.3c cores für die Peptidyltransferase	48
3.6.2	Rekonstitution mit sauberen und aktiven Proteinen der 50S Untereinheit des E. coli Ribosoms	57
3.6.2.1	Herstellung und Berechnung der einzusetzenden Proteine	57
3.6.2.2	Analyse mit hochgereinigten Proteinen des 4.3c cores	60
3.6.2.3	Analyse mit hochgereinigten Proteinen der SP1.3 Fraktion	63
3.7	Die Bedeutung der RNA für die Peptidyltransferase-Aktivität	66
4	Diskussion	68
	Zusammenfassung	78
	Literaturverzeichnis	80
	Lebenslauf	87
	Danksagung	88

1 Einleitung

Das "genetische Dogma", 1958 von Crick aufgestellt, lautet: DNA macht RNA und RNA macht Protein. Die Richtigkeit des "genetischen Dogmas" ist heute unbestritten. Jedoch mußte die erste Aussage (DNA macht RNA) modifiziert werden, nachdem ein Enzym, die "Reverse Transcriptase", entdeckt wurde, die virale RNA in DNA umschreiben kann. Diese DNA kann in die Wirts-DNA integriert werden (Baltimore, 1970, Temin und Mizutani , 1970, Übersicht Green und Gerard, 1974). Die zweite Aussage des "genetischen Dogmas" (RNA macht Proteine), besitzt jedoch noch dogmatischen Charakter, d.h. es ist bis heute kein Prozeß bekannt, bei dem die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt werden kann in eine Nukleotidreihenfolge einer RNA. Demnach muß heute das "genetische Dogma" folgendermaßen dargestellt werden:

DNA ⟷ RNA ⟶ PROTEINE

In allen lebenden Zellen obliegt der gerichtete Vorgang der Übersetzung einer Nukleotidsequenz einer RNA in eine Aminosäuresequenz des Proteins den kleinsten organisierten Zellenorganen, den Ribosomen. Eine grobe Einteilung unterscheidet zwei Klassen von Ribosomen:

1. Die Ribosomen im Cytoplasma der Eukaryonten mit einem Sedimentationswert von ungefähr 80S. Je 50 % der Masse dieser Ribosomen bestehen aus RNA beziehungsweise Proteinen. Diese Ribosomen zerfallen unter bestimmten Bedingungen in eine kleine 40S und eine große 60S Untereinheit.

2. Die zweite Klasse stellen 70S Ribosomen dar, die in Prokaryonten und in den Chloroplasten der Eukaryonten gefunden werden. Sie bestehen zu zwei Drittel aus RNA und einem Drittel Protein, und auch sie zerfallen in eine kleine 30S und eine doppelt so schwere große 50S Untereinheit. (Zu der zweiten Klasse zählen auch die

noch kleineren 55S Ribosomen in den Mitochondrien von Eukaryonten. Sie bestehen zu 40 % aus RNA und 60 % Protein).

Die verschiedenen Ribosomenarten synthetisieren in der gleichen Weise die Proteine, d.h. jedem Funktionsschritt, der bei einer Ribosomenart untersucht wird, kann ein entsprechender der anderen Ribosomenarten zugeordnet werden. Es ist sinnvoll, bei der prinzipiellen Klärung der Vorgänge sich auf die Ribosomen des bestuntersuchten Organismus, des Bakteriums Escherichia coli, zu beschränken. Deshalb sind praktisch alle funktionellen Untersuchungen zunächst am E. coli Ribosomen durchgeführt worden.

Die kleine Untereinheit des E. coli Ribosoms besteht aus einem 16S RNA Molekül und 21 verschiedenen Proteinen (S1 - S21). Die große 50S Untereinheit besteht aus zwei RNA Molekülen, einem kleinen 5S und einem großen 23S Molekül, und 34 verschiedenen Proteinen (L1 - L34). Alle ribosomalen Proteine sind isoliert und mit chemischen, physikalischen sowie immunologischen Methoden charakterisiert worden (Übersicht Wittmann, 1974). Die Aminosäuresequenz von etwa 50 % der 55 ribosomalen Proteine wurde bisher bestimmt (Übersicht Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974). Die Basensequenz, der aus 120 Nukleotiden bestehenden 5S RNA wurde aufgeklärt (Brownlee et al, 1968), die der aus 1600 Nukleotiden bestehenden 16S RNA zu etwa 90 % (Übersicht Fellner, 1974, Ehresmann et al, 1972 u. 1975). Etwa 25 % der 23S RNA Sequenz sind bekannt (Branlant et al, 1975).

Die komplizierte Struktur des Ribosoms reflektiert ein komplexes Funktionsspektrum. Mehr als 20 verschiedene Partialfunktionen der ribosomalen Untereinheiten sind bekannt.

Im Zentrum der Ribosomenforschung stehen heute zwei Problemkreise:

1. Wie sieht die Struktur des Ribosoms aus?
2. Welches Strukturelement ist an welcher ribosomalen Partialfunktion beteiligt?

Die große Zahl der Untersuchungen, die sich mit dem zweiten Problemkreis beschäftigen, lassen sich auf eine begrenzte Anzahl methodischer Ansätze zurückführen. So wurden Antibiotika, die spezifische ribosomale Funktionen hemmen, (Übersicht Vazquez, 1974) und Antikörper gegen spezifische ribosomale Proteine (Übersicht Stöffler, 1974) eingesetzt sowie die Techniken der Affinitätsmarkierung (Übersicht Cantor, 1974), der Rekonstruktion (Traub und Nomura, 1968; Nierhaus und Dohme, 1974) und der Fragmentation (Morgan und Brimacombe, 1972; Roth und Nierhaus, 1973) benutzt.

Die wesentlichen Aufgaben des Ribosoms bestehen darin, die Genauigkeit zu gewährleisten, mit der die RNA Information in eine definierte Aminosäuresequenz übertragen wird, und die Knüpfung der Peptidbindung zu ermöglichen. Das enzymatische Zentrum, das die Knüpfung der Peptidbindung katalysiert, wird als Peptidyltransferasezentrum bezeichnet und ist auf der 50S Untereinheit lokalisiert (Staehelin et al, 1969). Die Suche nach den enzymatisch wichtigen Proteinen, die an der Knüpfung der Peptidbindung beteiligt sind und damit zum Peptidyltransferasezentrum gehören, führte mit den verschiedenen Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wurden die folgenden Proteine der 50S Untereinheit als am Peptidyltransferasezentrum beteiligt beschrieben: L2, L4, L6, L11, L13, L14, L15, L16, L18, L23, L24, L27, L32 und L33 (Literatur siehe Diskussion). Trotz des großen experimentellen Aufwandes, mit dem man bislang das Peptidyltransferasezentrum analysiert hat, ist es nicht klar, ob alle die vorstehenden Proteine direkt an dem Peptidyltransferasezentrum beteiligt sind oder nur in dessen Nachbarschaft liegen oder aber für die Konformation des Peptidyltransferasezentrums von Bedeutung sind. Es ist sogar vorstellbar, wenn auch nicht wahrscheinlich, daß das enzymatisch aktive Protein bislang von keiner der an-

gewandten Methoden erfaßt worden ist.

Um die Vieldeutigkeit der vorliegenden Experimente einzuschränken, haben wir uns entschlossen, mittels der "Totalrekonstitution" der großen E. coli Untereinheit (Nierhaus und Dohme, 1974) den Minimalsatz ribosomaler Strukturelemente zu bestimmen, der ein aktives Peptidyltransferasezentrum zu rekonstituieren vermag. Diejenigen ribosomalen Strukturelemente, die nicht in diesem Minimalsatz enthalten sind oder gegen andere ausgetauscht werden können, können demnach nicht die enzymatische Aktivität der Peptidyltransferase ausüben. Damit kann zum ersten Mal die Zahl der Proteine, die möglicherweise die enzymatische Reaktion direkt ausüben, eindeutig eingeschränkt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Erklärung der Abkürzungen

RNA	Ribonukleinsäure
Poly(U)	Polyuridylsäure
TP50	Alle Proteine der 50S Untereinheiten
A_{260}-Einheit	Diejenige Menge Ribosomen oder ribosomaler Partikel, die, aufgelöst in 1 ml, bei der Schichtdicke 1 cm und der Wellenlänge 260 nm die Absorption 1 hat.
e.u.	Äquivalenz Einheiten; Proteinmenge eines oder mehrerer Proteine, die auf 1 A_{260}-Einheit von 50S Untereinheiten vorhanden ist.
P.T.	Peptidyltransferase
x% w/v	x g per 100 ml
PEG	Polyäthylenglycol
MgAc	Mg-Azetat
NaAc	Na-Azetat
xc	core-Partikel, erhalten von der 50S Untereinheit nach der Inkubation mit x M LiCl.
xc HAc Proteine	Essigsäureextrahierte Proteine der xc core-Partikel
SPx	Split-Proteine abgespalten von der 50S Untereinheit nach der Inkubation mit x M LiCl.
1D	Eindimensionale Gelelektrophorese

2.2 Material

2.2.1 Proteine und RNA

Für einige unserer Experimente zu Beginn dieser Arbeit wurden hoch gereinigte Proteine eingesetzt, die nicht von uns iso-

liert wurden. Sie wurden nach der Methode von Hindennach et al, 1971, gereinigt und uns freundlicherweise von Dr. H. G. Wittmann zur Verfügung gestellt.
Das 18S Fragment der 23S RNA von E. coli, das vom 3' Ende aus etwa zwei Drittel der 23S RNA darstellt, wurde uns dankenswerterweise von Dr. A. Zamir und Dr. M. Lindner übersandt.

2.2.2 Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
New England Nuclear, Boston, USA	(^{3}H)Leucin (47 Ci/m Mol)
Amersham / Buchler, England	(^{14}C)Phenylalanin (0.46 Ci/m Mol)
Merck Schuchardt, Höhenbrunn	Polyäthylenglycol 6 000
Serva, Heidelberg	Bentonite SF Natriumdodecylsulfat
Packard, Frankfurt/M.	Instagel
Oxoid, Hamburg	Bacto-trypton und Hefeextrakt
Boehringer, Mannheim	tRNA aus E. coli Poly-Uridylsäure
Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Schweden	Sephadex G100 Gel
Fluka A.G., Buchs, Schweiz	TEMED Mercaptoäthanol
Schwarz / Mann, Orangeburg, USA	Kristalline Sucrose (ultra pure)

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck in Darmstadt erworben.

2.2.3 Puffer

PO_4^--Puffer: 10 mM K_2HPO_4-KH_2PO_4, pH 7.6, 1 mM $MgCl_2$, 6 mM Mercaptoäthanol.

TM10-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgAc, 0.5 mM EDTA

Li-TM10-Puffer: 5 M LiCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgAc, 0.5 mM EDTA.

TM4-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 4 mM MgAc, 0.2 mM EDTA

TM4-6U-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 4 mM MgAc, 0.2 mM EDTA, 6 M Harnstoff.

Rek.-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM MgAc, 1 mM EDTA, 6 mM Mercaptoäthanol, 400 mM NH_4Cl.

1 x TEB-SDS-Puffer: 90 mM Tris-H_3BO_4, pH 8.3, 2.5 mM Na_2-EDTA, 0.2 % SDS.

RNA-Säulenpuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 1 % Methanol.

1D-Puffer: 120 mM Tris-H_3BO_4, pH 8.6, 6 M Harnstoff, 6 mM EDTA.

Phenol-SSC-EDTA: Phenol, gesättigt mit 15 mM Na-Zitrat, pH 7.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA.

Totalrekonstitutions-Mix (TR-Mix): 110 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4 M NH_4Cl, 4 mM MgAc, 0.2 mM EDTA, 20 mM Mercaptoäthanol.

2.2.4 Gele, Färbe- und Entfärbelösungen

1. 1D-Gel (für 50 Proben):

Harnstoff p.a.	144.0 g
Acrylamid	32.0 g
Bisacrylamid	1.2 g
Titriplex III	3.2 g
Borsäure	12.8 g
Tris	19.4 g

in 369 ml lösen. Vor Gebrauch 1.2 ml TEMED hinzugeben.

2. Persulfatlösung: 0.7 g Persulfat in 10 ml H_2O lösen.

3. Probengel der 1D der 2D-Gelelektrophorese:

Harnstoff p.a.	48	g
Acrylamid	4	g
Bisacrylamid	0.2	g
Titriplex III	0.085	g
Borsäure	0.32	g

in 99 ml lösen.

4. Riboflavin-Persulfatlösung:
5 mg Persulfat in 1 ml Riboflavinlösung (50 mg Riboflavin in 10 ml H_2O) lösen.

5. Elektrolytpuffer der 1D:

Harnstoff reinst	36	%
Titriplex III	0.24	%
Borsäure	0.96	%
Tris	1.45	%

6. 2D-Gel:

Harnstoff reinst	6300 g	vorlösen in 9000 ml
Acrylamid	3150 g	vorlösen in 6000 ml
Bisacrylamid	43,8 g	
Eisessig	457 ml	
5N KOH	83.8 ml	

auf 16 920 ml auffüllen und lösen; vor Gebrauch 50.7 ml TEMED dazu.

7. Persulfatlösung der 2D:
20 g Persulfat in 400 ml H_2O lösen.

8. Elektrolyt-Puffer 2D:
1.4 % Glycin
0.15 % Eisessig

9. Färbebad der 2D (Amido-Schwarz-Bad):
66 g Amido-Schwarz
840 ml Eisessig
auf 12 l auffüllen

10. RNA-Gel:
    3,1 %ige Acrylamidlösung + 1.8 mg SDS/ml

11. RNA-Elektrophorese-Puffer:
    90 mM Tris-Borsäure (pH 8.3)
    2.5 mM Na_2 EDTA
    0.2 % SDS

12. Färbelösung RNA-Gele:
    0.1 % Toluidinblau
    1 % Essigsäure
    20 % Methanol

13. Entfärbelösung RNA-Gele:
    20 % Methanol
    1 % Essigsäure

2.3 Isolierung von Ribosomen und core-Partikeln

2.3.1 Fermentation von Escherichia coli K12, Stamm A19

Die E. coli Zellen wurden in einem New Brunswick 150 l Fermenter im Institut für Gärungsgewerbe in Berlin gezogen. Als Medium für 100 l wurden 1000 g Bacto-Trypton, 500 g Hefeextrakt und 500 g NaCl sowie autoklavierte Glucoselösung (200 g/l) benutzt. Der Fermenter wurde mit 2.5 l Vorkultur (25 g Bacto-Trypton, 13 g Hefeextrakt, 13 g NaCl, 2.5 ml 1 N NaOH und 25 ml 20 %ige Glucose) die über Nacht mit einer getesteten Einzelkolonie von E. coli K12, Stamm A19 RNase I^-, Met^- (Gesteland, 1966) angesetzt und bei 37° C gewachsen war, angeimpft. Dem Fermenter wurden 1 g Antischaum Silikon SE2 zugegeben. Bei einer Dichte von 0.5 A_{640}-Einheiten wurde die Fermentation abgebrochen (Zugabe von drei Eimern Eis), und die Zellen wurden mit einer Padberg Zentrifuge in etwa 30 Minuten abgefahren. Wegen des frühen Abbruchs befanden sich die Zellen in der frühlogarithmischen Wachstumsphase. Ribosomen, die aus diesen Zellen isoliert werden, zeichnen sich durch eine hohe Aktivität aus und lassen sich vorzüglich

rekonstituieren (Nierhaus und Dohme, 1974). Die Zellen wurden in Plastikfolie eingepackt, in Trockeneis eingefroren und bei -80° C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug ein Gramm E. coli Zellen pro ein Liter Medium.

2.3.2 Präparation von 50S Untereinheiten

100 g Escherichia coli K12, A19 Zellen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase (siehe 2.3.1) wurden mit DNase (1µg/ml) in 300 ml PO_4^--Puffer gewaschen und abgefahren (10 Minuten/30 000×g). Das Sediment wurde mit Aluminiumoxid-Pulver (Alcoa) 30 Minuten gemahlen (Retsch-Mühle), und nach Zugabe von weiteren 300 ml PO_4^--Puffer wurde der Rohextrakt durch zweimalige Zentrifugation (10 Minuten und 40 Minuten je bei 30 000 x g) von Alcoa und Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde für 6 Stunden bei 150 000 x g einer Ultrazentrifugation unterworfen. Im Sediment befanden sich die Ribosomen, die in PO_4^--Puffer resuspendiert wurden. Aus den aufgearbeiteten 100 g Zellen erhält man ca. 70 000 A_{260}-Einheiten Ribosomen. Nach zweimaliger Dialyse gegen denselben Puffer (jeweils 2 Stunden) wurden die Ribosomen einer Zonal-Zentrifugation unterworfen. Pro Rotor wurden 7 000 A_{260}-Einheiten Ribosomen aufgetragen. Nach der Zonal-Zentrifugation werden die Fraktionen, die 30S Untereinheiten und jene, die 50S Untereinheiten enthielten, getrennt gesammelt. Bei 10 mM MgAc und 10 % (w/v) PEG 6000 werden die Untereinheiten ausgefällt (30 Minuten/0° C)(Expert-Besançon et al, 1974), durch Zentrifugation sedimentiert (30 Minuten/30 000 x g) und in TMNSH-Puffer resuspendiert(200-400 A_{260}-Einheiten/ml). Anschließend wurden die Untereinheiten im Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthesesystem auf Sauberkeit getestet. Die Verunreinigung mit den komplementären Untereinheiten betrug weniger als 3 %.

2.3.3 Herstellung von core-Partikeln und split-Proteinen durch LiCl-Behandlung

50S Untereinheiten werden hitzeaktiviert (15 Minuten/37° C) und anschließend in TM10-Puffer, der die gewünschte LiCl-Konzentration enthielt, inkubiert (5 Stunden/0° C, 15 A_{260}-Einheiten 50S im ml; Homann und Nierhaus, 1971). Durch Ultrazentrifugation (5 Stunden/150 000 x g) konnten die abgewaschenen Proteine (split-Proteine) als Überstand und der Restkörper (core-Partikel) als Sediment voneinander getrennt werden. Die core-Partikel wurden in TM4-Puffer resuspendiert, über Aceton-Trockeneis bei -70° C schockgefroren und in kleineren Portionen bei -80° C gelagert.

Die split-Proteine wurden dialysiert (4 x 45 Minuten/TM4-Puffer) und lyophilisiert. Nach Aufnahme in 66 % Essigsäure (um eventuell vorhandene RNA auszufällen, (45 Minuten/0° C rühren lassen)) wurde die Lösung zentrifugiert (30 Minuten/30 000 x g), das RNA-haltige Sediment verworfen, der Überstand gründlich gegen TM4-Puffer dialysiert (4 x 1 Stunde/2 l) und dann lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde entsprechend der weiteren Verwendung der Proteine in einem bestimmten Puffer aufgenommen und dialysiert.

2.4 Isolierung und Identifizierung ribosomaler Proteine

2.4.1 Essigsäureextraktion von Proteinen aus 50S Untereinheiten oder core-Partikeln

50S Untereinheiten oder core-Partikel wurden für 45 Minuten bei 0° C in 66 % Eisessig und 0.1 M MgAc gerührt (Hardy et al, 1969). Die RNA wurde dabei ausgefällt und nach Zentrifugation (30 Minuten/30 000 x g) verworfen. Die Proteine im Überstand wurden:

a) entweder durch Zugabe von 5 Volumen auf -20° C vorgekühltem Aceton gefällt und sedimentiert (30 Minuten/30 000 x g).

(Dies gilt für Ionen-Konzentrationen der Partikellösung bis zu 0.5 M monovalenter Ionen. Bei ≧0.5 M monovalenter Ionen gibt man 4.5 Volumen -20° C vorgekühltes Aceton und 1 Volumen -20° C vorgekühltes Äthanol zu).
Das Sediment wird in destilliertem Wasser resuspendiert (200 e.u./ml) und stufenweise mit 1 M ungepufferter Tris-Lösung auf pH 6 eingestellt. Anschließend wurde zweimal 45 Minuten gegen TM4-6U-Puffer, zweimal 45 Minuten gegen TM4-Puffer (500faches Volumen) und zweimal 45 Minuten gegen 500faches Volumen TM4-Puffer, der 0.01 % Essigsäure enthält, dialysiert. Die 0.01 % Essigsäure säuern den TM4-Puffer auf etwa pH 6 an. Damit bleiben die basischen ribosomalen Proteine besser in Lösung.

b) oder durch Lyophilisation getrocknet, in destilliertem Wasser resuspendiert und dann der oben beschriebenen Dialyseprozedur unterzogen.

Die Methode der Lyophilisation wurde in den Fällen vorgezogen, in denen nicht von 50S Untereinheiten sondern von core-Partikeln und split-Fraktionen, die nicht mehr alle 34 Proteine der 50S Untereinheit enthielten, ausgegangen wurde. In jedem Fall verhielten sich die Absorptionen A_{230}:A_{260}: A_{280} wie 5 : 1 : 1, d.h. nach der Essigsäureextraktion war keine RNA mehr vorhanden.

2.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970)

Die Identifizierung der ribosomalen Proteine wurde mit der 2D-Gelelektrophorese erreicht. Dabei werden die Proteine in der ersten Dimension vor allem auf Grund ihrer spezifischen Nettoladung und in der zweiten Dimension im wesentlichen auf Grund ihres Molekulargewichtes identifiziert.

Die Elektrophorese der Proteine in der ersten Dimension läuft in 18 cm langen Glasröhrchen (Ø außen 7 mm; innen 5 mm) ab, die bis zur Mitte mit 1D-Gel gefüllt werden. Darauf wird die Probe (von 100 A_{260}-Einheiten Essigsäureproteine) in 2 ml

Probengel gelöst, aufpolymerisiert, und die Röhrchen werden dann mit der Lösung für das 1D-Gel bis zum oberen Rand aufgefüllt. Jeweils 20 Gelröhrchen werden in einer Kammer angeschlossen, (39 Stunden/70 V), wobei die etwas längere 1D-Gelseite (9 cm) an die Kathode angeschlossen und die etwas kürzere Seite an die Anode angeschlossen wurde. Dadurch wurde erreicht, daß die wenigen sauren ribosomalen Proteine in das kürzere Gelende und die relativ vielen basischen ribosomalen Proteine in das längere Gelende wanderten. Als Elektrophoresepuffer diente der 1D-Puffer mit einem pH 8.6.

Wenn es sich bei den Proben um Säulenfraktionen einer Sephadex G100-Säule handelte, so konnten diese wenigen Banden, nachdem sie gefärbt und wieder entfärbt wurden, nach der ersten Dimension der zweidimensionalen Elektrophorese bereits identifiziert werden. Waren es dagegen Proteine aus einer core-Partikel oder aus einer intakten Untereinheit, so konnte eine befriedigende Auflösung erst nach der zweiten Dimension erhalten werden.

Nach der Elektrophorese in der ersten Dimension wurden die Gele aus ihren Gelröhrchen entfernt und auf die Gelplatte (20 x 20 x 0.4 cm) aufpolymerisiert. 200 ml entgaste Lösung für ein 25 %iges Gel wurde zusammen mit dem Polymerisationsstarter (Persulfat) in eine flache Wanne gegossen, in die eine Kammer gestellt wurde, die fünf senkrechte gleichgroße Schlitze aufwies (4 mm breit, 20 cm lang, 20 cm hoch). Nachdem das 25 %ige Bodengel polymerisiert war, wurden die Schlitze mit einer Lösung für ein 18 %iges Gel aufgefüllt. Auf das 18 %ige Gel wurden die 18 cm langen 1D-Gele aufpolymerisiert. Die Gestelle sind so gestaltet, daß die oberen Enden der Schlitze (und damit das obere Ende der Gelplatte) in einem Pufferreservoir mündeten. Entsprechendes gilt auch für die unteren Enden der Schlitze.
Das obere Puffergefäß wurde mit der Anode verbunden, das untere mit der Kathode. Der 2D-Elektrolytpuffer hat einen pH von 4. In die oberen Puffergefäße wurden 1 ml 5 %iges $CuSO_4$

je Kammer als Markierung der Ionenfront zugegeben (zweite Dimension 100 V/22Stunden). Nach Abbruch der Elektrophorese werden die Platten 2 Minuten in Amidoschwarz 10B Färbelösung gefärbt und dann über Nacht unter fließendem Leitungswasser entfärbt. Nach weiteren 2 bis 3 Tagen in einer etwa 3 %igen Essigsäurelösung sind die Platten gut entfärbt, und man kann die ribosomalen Proteine als einzelne blaue Punkte identifizieren.

2.4.3 Proteinisolierung über Sephadex G100-Säulen

Die Proteine, die durch Essigsäureextraktion von RNA befreit wurden (siehe 2.3.1), werden nach der Lyophilisation in 2 bis 4 ml TM4-6U-Puffer aufgenommen und dialysiert (2 x 12 Stunden/TM4-6U-Puffer) und mit 1/10 Volumen 60 %iger Sucrose versetzt. Damit sind die Vorbereitungen zum Auftrag auf eine Sephadex G100 Säule abgeschlossen. Es wurden Säulen aus Duranglas (Füllhöhe 2 m, Innendurchmesser 3 cm) mit entgastem, fünf Stunden lang bei 90° C vorgequollenem Sephadex G100-Gel gefüllt und mit TM4-6U-Puffer äquilibriert. Der Arbeitsdruck wurde bei neuen Säulen auf etwa 0.7 m mit einer Boyle-Mariotte'schen Flasche festgelegt. Nach dem Unterschichten der Probe wurde das Eluat in einen LKB Ultrarac Fraktionssammler 7000 gesammelt. Die Fraktionen wurden auf Zeit eingestellt (1 Tropfen/18 Sekunden, pro Fraktion 50 Minuten, d.h. Fraktionsgröße 7.5-8 ml).
Mit einem Zeiss M4QIII Photometer wurden die A_{230}-, A_{260}- und A_{280}-Werte jeder zweiten Fraktion gemessen und dann graphisch dargestellt. Alle Fraktionen, die Proteine enthielten, wurden gegen TM4-Puffer gründlich dialysiert (4 x 1000faches Volumen je eine Stunde), lyophilisiert, in TM4-Puffer ($\sim$ 3 A_{230}/ml) resuspendiert, in Aceton-Trockeneis bei -70° C eingefroren und bei -80° C gelagert.
Die Proteine wurden mit der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese identifiziert und, wenn es keine eindeutige Aussage gab, mit der 2D-Gelelektrophorese (siehe 2.3.2) überprüft.

Nach dieser Prozedur konnte der verbleibende Rest für Rekonstitutionen und Funktionsteste verwendet werden.

2.5 Isolierung und Identifizierung ribosomaler RNA

2.5.1 RNA Präparation durch Phenolisierung

Die RNA der 50S Untereinheit (23S RNA und 5S RNA) wurde durch dreimalige Phenolextraktion gewonnen. Das dazu verwendete Phenol wurde wie folgt vorbehandelt:
Destilliertes Phenol wurde im Kältelabor einmal mit 1 Volumen SSC-EDTA (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA; pH 7.5) ausgeschüttelt. Das so erhaltene Phenol-SSC-EDTA wurde in 10 ml Portionen eingefroren und bei -20° C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde zu den aufgetauten Portionen 1/20 Volumen 1 M Tris (ungepuffert) hinzugegeben.

Extraktion:

50S Untereinheiten (≙ 400 A_{260}-Einheiten/ml) wurden mit 1/10 Volumen 10 %igem SDS, 1/20 Volumen 2 %igem Bentonit und 1.2 Volumen Phenol-SSC-EDTA/Tris versetzt. Bei 4° C wurde die Probe stark geschüttelt (8 Minuten) und zur Phasentrennung zentrifugiert (10 Minuten/15 000 x g). Die obere, wässerige Phase wurde abgehebert und erneut mit 1.2 Volumen Phenol-SSC-EDTA/Tris durch starkes Schütteln vermischt. Wiederum wurde die Probe zur Phasentrennung zentrifugiert (10 Minuten/15 000 x g) und die wässerige Phase abgehebert. Ein drittes Mal wurde die Probe mit 1.2 Volumen Phenollösung versetzt und jetzt aber nur fünf Minuten stark vermischt. Nachdem die Probe erneut zentrifugiert wurde, haben wir jetzt ganz vorsichtig die wässerige Phase abgehoben, damit keine Phenolreste verbleiben, wenn wir anschließend mit 2 Volumen Äthanol (Äthanol plus 1/50 Volumen 1 M Tris-HCl, pH 7.8) die RNA ausfällen (15 Stunden/-20° C).
Nach einer Zentrifugation (45 Minuten/16 000 x g) wurde die RNA in sterilem TM4-Puffer resuspendiert (200-400 A_{260}-Einheiten/ml). Um Phenolreste zu entfernen, wurde die in TM4-

Puffer resuspendierte RNA 3 mal 20 Minuten gegen TM4-Puffer (500faches Volumen) dialysiert. Anschließend wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, die RNA bei -70° C (Aceton, Trockeneis) schockgefroren und bei -80° C gelagert.

2.5.2 Trennung von 23S und 5S RNA

Um die RNA der 50S Untereinheit (23S RNA und 5S RNA) präparativ zu trennen, wurde die RNA, die durch Äthanol gefällt wurde (2.5.1), in sterilen RNA-Säulen-Puffer resuspendiert (500 A_{260}-Einheiten/ml) und mit 1/10 Volumen 60 %iger RNase-freier Sucrose vermischt. Dieses RNA-Sucrosegemisch wurde auf eine Sephadex G100-Säule aufgetragen (Säulenfüllhöhe 2 m, Innendurchmesser 3 cm, äquilibriert mit RNA-Säulen-Puffer). Es wurden 3 000 A_{260}-Einheiten RNA auf die Säule aufgetragen. Der Arbeitsdruck der Säule war 1 m. Es wurden 7 ml pro Fraktion gesammelt.

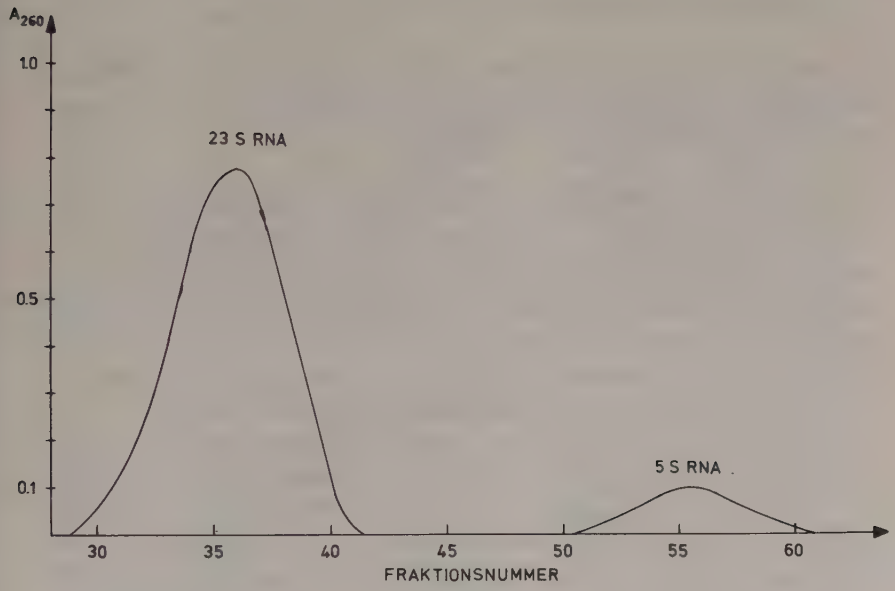
Die Absorption bei 260 nm wurde gemessen, und es ergab sich folgendes Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 1).

Die Fraktionen, die entweder 23S oder 5S enthielten, wurden gesammelt und mit Äthanol ausgefällt (siehe 2.5.1). Nach der sich anschließenden Zentrifugation wurde das Sediment, daß die RNA enthielt, in sterilem TM4-Puffer resuspendiert (23S RNA zu 200-400 A_{260}-Einheiten/ml; 5S-RNA zu 40 A_{260}-Einheiten/ml), in kleinen Portionen abgepackt, mit Trockeneis-Aceton eingefroren und bei -80° C gelagert.

Alle bisher beschriebenen präparativen Arbeiten (Präparation von 50S Untereinheiten, Herstellung von core-Partikeln und split-Proteinen, Isolierung und Identifizierung ribosomaler Proteine, Isolierung und Identifizierung ribosomaler RNA) wurden, auch wenn nicht besonders darauf hingewiesen wurde, im Kältelabor bei +4° C und mit sterilen Gefäßen ausgeführt. Außerdem wurde jeweils darauf geachtet, daß mit Handschuhen

Abbildung 1

Trennung von 5S und 23S RNA durch Gelfiltration



Die Trennung der 5S und 23S RNA wurde mit einer Sephadex G100-Säule durchgeführt. Die Füllhöhe betrug 2 m, und der Innendurchmesser war 3 cm. Das Gel wurde mit RNA-Säulen-Puffer äquilibriert (siehe 2.2.3). Die Auftragsmenge war 3 000 A_{260}-Einheiten RNA, die mit 1/10 Volumen 60 %ige Sucrose versetzt wurde. Der Arbeitsdruck betrug 1 m und der Fraktionssammler wurde so eingestellt, daß 7 ml pro Fraktion gesammelt wurden.

gearbeitet wurde. Alle isolierten Partikel wurden, sofern sie nicht gleich weiterverarbeitet oder in funktionellen Tests verbraucht wurden, über Aceton-Trockeneis bei -70° C eingefroren und bei -80° C gelagert.

2.5.3 SDS-Gelelektrophorese (Ceri und Maeba, 1973)

Mit der SDS-Gelelektrophorese wurde die Intaktheit ribosomaler RNA getestet. Dazu muß die RNA nicht erst, wie in 2.5.1 beschrieben, isoliert werden.

Es wurden Plastikröhrchen (12 cm lang, Innendurchmesser 5 mm) auf 10 cm mit 3.1 %iger Polyacrylamidlösung gefüllt, mit 15 µl destilliertem Wasser überschichtet und für 20 Minuten unter einer 1000 Watt Lampe polymerisiert. Das untere Ende des Gelröhrchens wurde mit einer von einem Gummiring gehaltenen Dialysemembran abgedichtet, damit während der Elektrophorese die Gele nicht herausgleiten konnten.
Die so fertiggestellten Gele wurden unbeladen einem Vorlauf unterzogen (20 Minuten, 2 mA/Gel). Die Proben (0.5 bis 1.5 A_{260}-Einheiten Ribosomen, Partikel oder RNA) wurden in 1 % SDS für 2 Minuten bei 70° C inkubiert, rasch im Eisbad heruntergekühlt, mit 1/10 Volumen 60 %iger RNase-freier Sucrose versetzt, die 1 % Bromphenolblau als Marker enthielt, und auf die 3.1 %igen Polyacrylamidgele aufgetragen; d.h. auf die Gele unter den Elektrophoresepuffer (90 mM Tris-Borsäure, pH 8.3, 2.5 mM EDTA und 0.2 % SDS) unterschichtet. Um ein Eindringen auch der größeren RNA-Partikel zu erreichen, wurde die Elektrophorese erst bei 0.5 mA/Gel für zwei Stunden und danach mit 1.5 mA/Gel für weitere zwei Stunden durchgeführt.

Nach Abbruch der Elektrophorese wurden die Gele aus den Röhrchen herausgeholt und für 5 Minuten in einer 0.1 %igen Toluidinblaulösung (1 % Essigsäure, 30 % Methanol) bei 4° C gefärbt. Anschließend wurde der nicht an RNA gebundene Farb-

stoff im Kältelabor mit Entfärbepuffer (20 % Methanol, 1 % Essigsäure) durch mehrmaliges Wechseln aus den Gelen herausgewaschen.

2.6 Herstellung des tRNA Fragments C-A-C-C-A-(^{3}H)Leu-Ac

2.6.1 Beladung der tRNA

Ein Gemisch von Escherichia coli tRNAs wird mit (^{3}H)Leucin, ATP-diNa und dem S-100 Überstand der Ribosomenherstellung bei definierten Ionenbedingungen (10 mM MgAc, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 und 5 mM Mercaptoäthanol) für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Beladung wird im Eisbad mit 1/10 Volumen 20 % NaAc pH 5.4 gestoppt. Im normalen Ansatz wurden 45 mg tRNA E. coli als Ausgangsmenge genommen, die 67.5 nMol tRNA Leu enthielt.

2.6.2 Extraktion der beladenen tRNA

Die beladene tRNA wird mittels der Phenolisierung extrahiert. Dazu wird das Gemisch mit einem Volumen 75 %igem Phenol versetzt und 10 Minuten geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung 10 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugiert. Die wässerige Phase, in der sich die RNA befindet, wird mit einer Pipette vorsichtig abgehebert und ein zweites Mal mit einem Volumen 75 %igem Phenol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten bei 12 000 rpm) wird die wässerige Phase abgenommen. Die sich darin befindliche beladene und unbeladene tRNA wird durch Zugabe von zwei Volumen Äthanol und Stehenlassen für drei Stunden bei -20° C ausgefällt. Durch Zentrifugation (10 Minuten, 10 000 rpm) erhalten wir das RNA-haltige Sediment, das mit Äthanol nachgewaschen wird, um Phenolreste zu entfernen. Nach einer folgenden Zentrifugation (10 Minuten bei 10 000 rpm) wird das Sediment durch Vakuumtrocknung im Exsiccator (1 Stunde) vom Äthanol befreit und in destilliertem Wasser resuspendiert. Zum Abschluß der Extraktion der belade-

nen tRNA wird die Ausbeute dadurch bestimmt, daß die Absorption bei 260 nm und die Radioaktivität gemessen wird.

2.6.3 T_1-Verdauung (Monro et al, 1969)

Die RNase T_1 spaltet Nukleinsäuren hinter Guanosin (G). Die nach 2.5.1 extrahierte RNA wird durch Zugabe von RNase T_1 (auf ein mg tRNA 1/200 mg RNase T_1) sowie 1/10 Volumen 20 % NaAc pH 5.4 und 1/50 Volumen 0.1 M EDTA gespalten, indem man sie unter diesen Bedingungen 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wird die Probe lyophilisiert und in einem möglichst geringen Volumen resuspendiert.

2.6.4 Erste Elektrophorese (Ghosh et al, 1967)

Es werden Papierstreifen (Whatman 3 MM-Papier, 7 cm x 43 cm) ausgeschnitten, die über ihre ganze Breite in der Mitte des Streifens die Auftragsstelle hatten. Die Probe wurde mit Pedersen-Pipetten unter kalter Föhntrocknung als möglichst dünner Streifen aufgetragen. Der Papierstreifen wurde mit dem Elektrolyt-Puffer (Pyridin: Essigsäure: H_2O = 1:10:189) von den Seiten her zur Probe hin befeuchtet, nachdem er auf dem Elektrophoresegerät aufgelegt war. Die Laufbedingungen waren 4 Stunden bei ~1500 Volt und ~30-50 mA, wenn zwei Streifen der oben angegebenen Größe verwendet wurden. Nach dem Lauf wurden die liegenden Papierstreifen mit dem Föhn kalt getrocknet. Der unterste, 0.5 cm breite Streifen wurde in ein Zentimeter große Abschnitte geschnitten, die auf Radioaktivität untersucht wurden. Auf diese Weise wurde ein Radioaktivitätsmaximum auf der Kathodenseite festgestellt. Das radioaktive Material wurde aus dieser Streifenregion eluiert, indem man den Streifenabschnitt über ein Zentrifugenglas geknickt mit Tesaband festklebte, mit destilliertem Wasser befeuchtete und mittels Zentrifugieren (5 Minuten bei 4 000 rpm) auswusch.

Da wir das acetylierte C-A-C-C-A-(^{3}H)Leu-Fragment verwenden

wollten, wurde das Eluat chemisch acetyliert, indem wir 8/30 Volumen 1 M NaAc, pH 5.0, und anschließend 4 x 8/300 Volumen Essigsäureanhydrid nach jeweils 15 Minuten hinzugaben. Das auf diese Weise acetylierte Eluat der ersten Elektrophorese wurde dann lyophilisiert und in einem möglichst kleinen Volumen resuspendiert.

2.6.5 Zweite Elektrophorese

Mit der zweiten Elektrophorese, die nach der Acetylierung durchgeführt wird, wird erreicht, daß die C-A-C-C-A-(^{3}H)Leu Fragmente, die nicht acetyliert wurden, wieder zur Kathodenseite und die acetylierten C-A-C-C-A-(^{3}H)Leu-Ac jetzt zur Anodenseite wandern. Nach der zweiten Elektrophorese wird das Radioaktivitätsmaximum auf der Anodenseite festgestellt und eluiert. Anschließend wird das Eluat bis zur Trockenheit lyophilisiert und derart in destilliertem Wasser resuspendiert, daß in einem µl etwa 50 000 cpm zu finden sind.

2.7 Rekonstitution und Funktionsteste

2.7.1 Partielle Rekonstitution von 50S Untereinheiten

Bei der partiellen Rekonstitution will man die in core-Partikel und split-Proteine zerlegten 50S Untereinheiten zu aktiven Partikeln rekonstituieren. Die partielle Rekonstitution wurde nach der von Staehelin et al (1969) entwickelten sowie von Nierhaus und Montejo (1973) modifizierten Methode durchgeführt.

Es wurden 2.5 A_{260}-Einheiten core-Partikel in TM4-Puffer mit 10 µl TR-Mix (110 mM Tris HCl, pH 7.5, 4 M NH_4Cl, 4 mM MgAc, 0.2 mM EDTA, 20 mM Mercaptoäthanol), 4 µl 400 mM MgAc und Proteinen in TM4-Puffer (isolierte Proteine, Säulenfrak-

tionen oder Totalprotein von 50S) in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 50° C für 90 Minuten inkubiert. Die Endkonzentrationen der Ionen entsprechen der des Rekonstitutions-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 400 mM NH_4Cl, 20 mM MgAc, 1 mM EDTA und 2 mM Mercaptoäthanol).

80 µl dieses Inkubationsgemisches (2.0 A_{260}-Einheiten Rekonstitutionspartikel) wurden für anschließende Aktivitätstests (Poly(U)abhängige Poly(Phe) Synthese oder Fragment-Reaktion) verwendet.

2.7.2 Totale Rekonstitution von 50S Untereinheiten (Nierhaus und Dohme, 1974)

Bei der totalen Rekonstitution geht man von proteinfreier RNA und von RNAfreien Proteinen oder Proteingemischen aus. Nach einer zweistufigen Inkubation erhält man die Rekonstitutionspartikel. Es werden 2.5 A_{260}-Einheiten 23S RNA und 0.1 A_{260}-Einheiten 5S RNA in 20 µl TM4-Puffer mit 10 µl Totalrekonstitutionsgemisch (TR-Mix siehe 2.2.3) und 3 bis 4 e.u. TP50 im Gesamtvolumen von 100 µl vermischt. Daraus ergab sich folgende Endkonzentration: 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 400 mM NH_4Cl, 4 mM MgAc, 0.2 mM EDTA und 2 mM Mercaptoäthanol. Nach einer ersten Inkubation von 20 Minuten bei 44° C wurden 4 µl 400 mM MgAc hinzugegeben, wodurch sich die MgAc Konzentration auf 20 mM erhöht. Unter dieser Ionenbedingung wurde eine weitere Inkubation für 90 Minuten bei 50° C durchgeführt. Nach Abbruch dieser zweiten Inkubation wurden aus dem Rekonstitutionsgemisch 80 µl entnommen und diese wurden in einen Aktivitätstest (Poly(U)abhängige Poly(Phe) Synthese oder Fragment-Reaktion) eingesetzt.

2.7.3 Fragment-Reaktion (Test auf Peptidyltransferase-Aktivität)

50S Untereinheiten und Rekonstitutionspartikel können mit dem Fragment-Reaktionstest (Monro, 1971, modifiziert von Nierhaus

und Montejo, 1973) auf die Fähigkeit, eine Peptidbindung zu knüpfen, untersucht werden. Die Reaktionspartner dieser Peptidbindung sind das tRNA Fragment C-A-C-C-A-(^{3}H)Leu-Ac und das Antibiotikum Puromycin (PM).

Wie in 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben, werden 80 µl der Partikel (2 A_{260}-Einheiten in Rekonstitutionspuffer) mit 80 µl einer das tRNA-Fragment C-A-C-C-A-(^{3}H)Leu-Ac (50 000 cpm) enthaltenen Pufferlösung und 80 µl einer Äthanol-Puromycinlösung vermischt.
Die Endkonzentrationen sind: 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 135 mM NH_4Cl, 250 mM KCl, 20 mM MgAc und 1 mM Puromycin in 33 % Äthanol. Nach 45 Minuten Inkubation bei 0° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0.3 Na-Azetat, gesättigt mit $MgSO_4$, gestoppt. Es wurden 1.5 ml Äthylacetat zugegeben, und, nach intensivem Schütteln zur Phasentrennung wurden die Proben fünf Minuten stehengelassen. 1 ml der oberen organischen Phase wurde abgehebert und mit 5 ml Instagel vermischt und dann auf Radioaktivität untersucht.

2.7.4 Poly(U)abhängige Poly(Phe)-Synthese (Nierhaus et al, 1973)

Das Poly(U)abhängige Poly(Phe)-System mißt die ribosomalen Elongationsaktivitäten bei limitierenden Ribosomenkonzentrationen.
Im System sind in 150 µl: 1 A_{260}-Einheit 30S Untereinheiten und 2 A_{260}-Einheiten 50S Untereinheiten, 40 µl Poly(U), 3 µg Pyruvatkinase, 12 µl S150 und 1 A_{260}-Einheit tRNA enthalten. Es ergaben sich folgende Endkonzentrationen:
12.25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM NH_4Cl, 12.25 mM MgAc, 0.04 mM GTP, 1.3 mM ATP, 1.5 µM (^{14}C)Phenylalanin und 30 µM (^{12}C)Phenylalanin. Das Gemisch wird für 45 Minuten bei 30° C inkubiert. 1 Tropfen 1 %iges Albumin und 3 ml 5 %ige Trichloressigsäure werden hinzugegeben, und dann erfolgt eine zweite Inkubation (10 Minuten/90° C). Die in der ersten Inkubation

synthetisierten radioaktiven Polyphenylalanin-Moleküle, die aus mehr als 4 Aminosäuren bestehen, werden beim anschließenden Filtrieren im Gegensatz zu den freien Aminosäuren auf dem Filter zurückgehalten. Nach Trocknung des Filters mit einem 1:1 Gemisch aus Diäthyläther und Äthanol kann man die Filter in 5 ml Instagel im Packard Szintillationszähler auf Radioaktivität untersuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Experimenteller Ausgangspunkt für die Rekonstitution des Peptidyltransferase-Zentrums

50S Untereinheiten können durch Waschen in Lösungen mit steigenden Lithium-Konzentrationen in core-Partikel und split-Proteine aufgetrennt werden. Core-Partikel, die mit 1 M Lithiumchlorid (1.0c Partikel) oder höheren LiCl Konzentrationen gewaschen werden, verlieren ihre Aktivität in der Fragment-Reaktion; d.h. sie sind allein nicht mehr in der Lage, Peptidbindungen zu knüpfen. Diese Partikel (z.B. 1.2c) können ihre Aktivität zurückerhalten, wenn man sie mit den komplementären split-Proteinen (SP1.2) unter Rekonstitutionsbedingungen inkubiert (Staehelin, Maglott und Monro, 1969; Nierhaus und Montejo, 1973). Ein weiterer Effekt der steigenden Lithiumchlorid-Konzentration ist es, daß immer mehr Proteine von der core-Partikel abgewaschen werden und damit in der split-Protein Fraktion zu finden sind (siehe Homann und Nierhaus, 1971, und Tabelle 1).

Interessanterweise war es nicht nur möglich, das inaktive 1.2c core mit den komplementären split-Proteinen durch Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen zu reaktivieren, sondern es zeigte sich, daß auch ein 4.0c, das mit den SP1.2 split-Proteinen unter Rekonstitutionsbedingungen inkubiert wurde, zu reaktivieren ist (siehe Tabelle 2). Es war also möglich, das 1.2c core, das mit 26 Proteinen besetzt ist, durch das 4.0c core zu ersetzen, auf dem nur maximal 12 Proteine zu finden sind. Keines der Proteine der split-Fraktion SP1.2 ist auf der 4.0c Partikel zu finden und umgekehrt (siehe Tabelle 1).

Diese Ergebnisse ermutigten uns, die Aufgabe in Angriff zu nehmen, eine Partikel zu rekonstituieren, die aus möglichst wenigen ribosomalen Komponenten besteht und dennoch in der Lage ist, Peptidbindungen zu knüpfen, also aktiv im P.T.-Test ist.

Tabelle 1: Proteingehalt verschiedener core-Partikel

Proteine der 50S Untereinheit	core-Partikel							
	1.3c	4.0c	4.3c	5.0c	1.2c a)	1.2c b)	1.2c c)	S
L1	+	(+)	-	-	+	+	+	
L2	+	(+)	-	-	+	+	+	
L3	+	+	+	+	+	+	+	
L4	+	+	+	(+)	+	+	+	
L5	+	-	-	-	(+)	+	+	
L6	-	-	-	-	-	±	+	
L7	(+)	-	-	-	(+)	+	-	
L8/L9	+	-	-	-	(+)	+	+	
L10	(+)	-	-	-	(+)	+	+	
L11	-	-	-	-	-	±	+	
L12	(+)	-	-	-	(+)	+	-	
L13	+	+	+	+	+	(+)	+	
L14	+	-	-	-	(+)	+	+	
L15	+	±	-	-	(+)	+	+	
L16	-	-	-	-	-	-	±	
L17	+	+	+	+	+	+	+	
L18	+	-	-	-	+	+	+	
L19	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	
L20	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	
L21	+	+	(+)	-	+	+	+	
L22	+	+	+	(+)	+	+	+	
L23	+	(+)	(+)	-	+	+	+	
L24	+	-	-	-	+	+	+	
L25	+	-	-	-	+	+	+	
L26	-	-	-	-	-	-	-	
L27	+	-	-	-	+	+	+	
L28	-	-	-	-	-	-	(+)	
L29	+	(+)	-	-	+	+	+	
L30	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	
L31	+	-	-	-	+	-	-	
L32	+	-	-	-	+	+	+	
L33	-	-	-	-	-	-	+	
L23	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	

Der Proteingehalt der core-Partikel wurde mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese abgeschätzt:

+	normale Proteinmenge
(+)	verringerte Proteinmenge
±	Protein in Spuren sichtbar
-	Protein nicht vorhanden
nb	Protein nicht bestimmt
1.2c a)	isoliert durch Zentrifugation
1.2c b)	isoliert durch PEG 6 000 Fällung
1.2c c)	isoliert durch Äthanolfällung

Tabelle 2: Rekonstitution von LiCl-core-Partikeln

Rekonstitution: core-Partikel	partielle Rekonstitution split-Protein	P.T.-Aktivität [cpm]
4.Oc	-	438
5.Oc	-	530
4.Oc	Spl.2	4 050
5.Oc	Spl.2	440
4.Oc	Sp4.O	4 406
5.Oc	Sp5.O	1 352
50S		12 154
LW		372

3.2 Optimierung der Isolierung von core-Partikeln und split-Proteinen

Es wurden 50S Untereinheiten mit 1.2 M LiCl in TM10-Puffer 5 Stunden bei 0° C gewaschen und anschließend auf verschiedene Art aus dem Inkubationsgemisch isoliert.
Folgende Methoden wurden verglichen:

a) Ultrazentifugation (5 Stunden/150 000 x g)
b) Präzipitation mit PEG 6 000
c) Äthanolfällung
d) Ultrazentifugation mit anschließender PEG 6 000 Fällung der resuspendierten core-Partikel und
e) Ultrazentifugation mit anschließender Äthanolfällung der resuspendierten core-Partikel.

Die durch die Methoden a bis e isolierten core-Partikel wurden mit und ohne Inkubation bei 50° C auf P.T.-Aktivität getestet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: P.T.-Aktivität der verschiedenen isolierten core-Partikel

core-Partikel	Isolierungs-methode	90 Minuten 50° C Inkubation	P.T.-Aktivität [cpm]
1.2c	a	+	701
1.2c	b	+	5 631
1.2c	c	+	14 127
1.2c	d	+	770
1.2c	e	+	1 105
1.2c	a	-	590
1.2c	b	-	806
1.2c	c	-	1 688
1.2c	d	-	601
1.2c	e	-	586
		Kontrollen	
		LW	601
		50S	20 604

Aus der Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß die 1.2c core-Partikel die mit Methode a und d aufgearbeitet wurden, weder ohne noch mit Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen P.T.-Aktivität zeigen. Diejenigen 1.2c core-Partikel, die mit Methode b und c aus dem 1.2 M LiCl isoliert wurden, zeigen mit Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen hohe Aktivität, und selbst ohne Inkubation ist eine signifikante Aktivität festzustellen. Mit der Methode e isolierte 1.2c core-Partikel zeigen nach Inkubation schwache aber signifikante P.T.-Aktivität und ohne Inkubation keine Aktivität.

Da wir annehmen, daß die P.T.-Aktivität von ribosomalen Proteinen abhängig ist, erwarten wir einen unterschiedlichen Proteinbesatz der 1.2c core-Partikel, die keine Aktivität

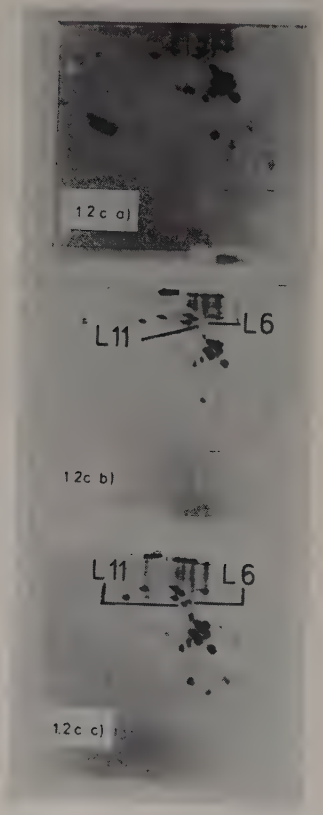
zeigen (Methode a, d, (e)) gegenüber denen, die nach Inkubation eine eindeutige Aktivität aufweisen. Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden daher die verschiedenen core-Partikel auf ihren Proteingehalt untersucht (siehe Abbildung 2 und Tabelle 1).

Zwischen den verschiedenen isolierten 1.2c cores bestehen hinsichtlich ihrer Proteingehalte Unterschiede. Im nicht aktiven 1.2c a) fehlen die Proteine L6, L11, L16, L20, L26, L28 und L33, die alle bis auf L26 in der aktiven 1.2c c)-Partikel vorhanden sind. Die inaktive Partikel (1.2c a)) enthält die Proteine L7/L12 und L31, die in der aktiven 1.2c c) Partikel fehlen. Auffällig ist die Parallelität von zunehmender Aktivität der 1.2c core-Partikel und dem stärkeren Auftreten der Proteine L6 und L11 auf den Gelen der zweidimensionalen Gelelektrophorese; dies könnte heißen, daß die P.T. von den Proteinen L6 und L11 abhängig ist.

Für unsere Versuche, das P.T.-Zentrum zu rekonstituieren, benötigen wir eine nicht aktive Partikel. Aus diesem Grund entschieden wir uns für die mit und ohne Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen inaktive Partikel (1.2c a)), die durch Zentrifugation aus dem Inkubationsgemisch isoliert wurde. Auch für die split-Proteinisolierung erwies sich diese Methode als günstig. Dagegen war es nicht möglich, aus mit PEG 6 000 gefällten core-Partikeln den Überstand zur Proteinisolierung über Azetonfällung und Lyophilisation zu verwenden, da in diesen Überständen das PEG 6 000 die Proteinisolierung außerordentlich erschwerte. Der bei der Methode c) entstehende Überstand konnte gleich gut zur Proteinisolierung verwendet werden, wie der mit der Methode a) erhaltene. Da aber die Methode a) die Isolierung von core-Partikeln und split-Proteinen in einem Arbeitsgang ermöglichte und diese Partikel wie gewünscht inaktiv waren, entschlossen wir uns für die Methode a), der Isolierung der core-Partikel über Zentrifugation und anschließender Gewinnung der split-Proteine aus dem Überstand durch Lyophilisation.

Abbildung 2

Proteingehalt der unterschiedlich isolierten 1.2c core-Partikel



Das 1.2c,isoliert nach Methode d) und e), entspricht dem 1.2c a), weil es ebenfalls zentrifugiert wurde und damit von den split-Proteinen abgetrennt war.
Erläuterungen der Bezeichnungen 1.2c a) bis 1.2c c) siehe Tabelle 1.

3.3 Erste Identifizierung der wesentlichen Proteine der SP1.6 split-Proteine mit dem 1.2c core

Mit den core-Partikeln (1.2c core) und split-Proteinen (SP1.6 split-Proteine) wollten wir bestimmen, welche Proteine aus dem SP1.6 wesentlich sind, um auf dem 1.2c core die P.T.-Aktivität zurückzugewinnen. Dazu wurden die SP1.6 split-Proteine über eine Sephadex G100 Säule getrennt. Die einzelnen Fraktionen, in denen sich Proteine durch Absorption bei 230 nm im Spektrometer nachweisen ließen, wurden zusammen mit dem 1.2c core rekonstituiert und anschließend im P.T.-Test (Fragment-Reaktions-Test) auf Aktivität untersucht (siehe Tabelle 4). In Tabelle 4 ist mit aufgenommen worden, welche Proteine in den Fraktionen, die Aktivität zeigten, zu finden waren. Die Bestimmung wurde mit der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese durchgeführt.

Tabelle 4: Test auf P.T.-Aktivität einzelner SP1.6 Säulenfraktionen nach Rekonstitution mit dem 1.2c core

core-Partikel	SP1.6 Säulenfraktionen	P.T.-Aktivität [cpm]	Proteine der Fraktion
1.2c	-	270	-
	42	438	L1, L2
	43	730	L1, L6, L2
	44	1 460	L1,...(Gel zu dünn angefärbt)
	46	3 112	L5, L6, L11
	47	3 036	L5, L6, L11, (L10)
	48	2 312	L5, L6, L11, L16, (L10)
	49	1 116	-
	50	564	L18, L15, L16, (L10)
	51	276	
	52	248	
	LW	195	ohne Rekonstitution,
	50S	3 170	nur Fragment-Reaktion

Nach dem Ergebnis dieses Versuches scheinen die wesentlichen Proteine der split-Fraktion L1, L5, L6, L10, L11 und L16 zu sein. Die Proteine L1 und L5 sind auf dem 1.2c core deutlich zu sehen (siehe Tabelle 1 und Abbildung 2). Somit sollten diese beiden Proteine nicht für die Zurückgewinnung der P.T.-Aktivität auf das 1.2c core entscheidend sein. Eine weitergehende Klärung, welche der Proteine L6, L10, L11 und L16 notwendig sind, war mit den partiell gereinigten Sephadex G100 Proteinen nicht möglich. Deshalb rekonstituierten wir die 1.2c Partikel mit den nach Standardmethoden (Hindennach et al, 1971) gereinigten Proteinen L10, L11 und L16 (Ergebnis siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Test auf P.T.-Aktivität mit gereinigten Proteinen und dem 1.2c core

core-Partikel	SP1.2	Proteine: L10	L11	L16	P.T.-Aktivität [cpm]
1.2c	-	-	-	-	434
-	-	+	+	+	413
1.2c	-	-	+	-	586
↓	-	-	-	+	824
↓	-	-	+	+	1 623
↓	-	+	+	+	1 476
↓	+	-	-	-	3 964
		50S			13 264

Aus der Tabelle 5 kann man ablesen, daß das 1.2c core mit dem Proteine L11, mehr noch mit dem Protein L16 und besonders gut mit beiden Proteinen eine P.T.-Aktivität zeigt. Die Proteine L11 und L16 allein mit dem 1.2c core bringen, wenn man die cpm Werte addiert, weniger Aktivität als die Rekonstitution des 1.2c cores mit beiden Proteinen. Es scheint ein kooperativer Effekt dieser beiden Proteine vorzuliegen. Dagegen

kann das Protein L10 die Aktivität, die mit dem 1.2c core und den Proteinen L11 plus L16 erreicht wurde, nicht steigern. Es liegt sogar ein leicht hemmender Einfluß vor. Die Proteine L6 und L10 allein mit dem 1.2c core ergaben keine Aktivität, wie in einem späteren Kontrollversuch gezeigt wurde. Abschließend zum 1.2c core können wir sagen, daß wir mit dem Protein L11 und dem Protein L16 allein signifikante P.T.-Aktivität auf dem 1.2c core erzeugen können. Außerdem scheint ein kooperativer Effekt dieser beiden Proteine vorzuliegen, da eine höhere als nur eine additive Aktivität mit den beiden Proteinen und dem 1.2c core erreicht werden kann.

3.4 Rekonstitution des P.T.-Zentrums auf dem 4.0c core mit SP1.3 Proteinen

Nachdem das 1.2c core mit einzelnen sauberen Proteinen aktiviert werden konnte, wollten wir versuchen, ob wir das 4.0c core mit den gleichen, nach Standardmethoden isolierten Proteinen L11 und L16 einer anderen Präparation ebenfalls reaktivieren können.

Tabelle 6: Reaktivierung des 4.1c cores mit homogenen Proteinen

e-	Saubere Proteine														SP1.3	P.T.-
					L8								L30	L32		Aktivität
el	L1	L2	L6	L7	L9	L10	L11	L15	L16	L20	L27	L29	L33	L33		[cpm]
c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	308
c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	308
c	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	298
c	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	318
c	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	314
c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 680
c	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	276
c	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	318
c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	276
c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 576
															50S	4 982

Aus der Tabelle 6 geht hervor, daß wir mit homogenen Proteinen und dem 1.2c core sowie dem 4.1c core keine Aktivität finden, obwohl die Kontrollversuche mit dem SP1.3 split-Proteinen positiv verlaufen sind. Ein oder mehrere Proteine der uns zur Verfügung gestellten homogenen Proteine waren offensichtlich nicht aktiv. Wir versuchten deshalb, ob die von uns über eine Sephadex G100 Säule partiell getrennten Proteine auch die 4.1c Partikel aktivieren konnten. In der Tabelle 7 werden zwei über Sephadex-Säulen gewonnene Präparationen von SP1.3 split-Proteinen in Rekonstitutionsversuchen miteinander verglichen. Dazu wurden Aliquots der partiell getrennten Proteine wieder vereinigt und mit einer 1.3c beziehungsweise 4.1c core Partikel rekonstituiert.

Tabelle 7: Test der SP1.3-Proteine aus zwei Sephadex-Säulen auf P.T.-Aktivität

core-Partikel	Proteine: 1.SP1.3-Säule	2.SP1.3-Säule	SP1.3	P.T.-Aktivit [cpm]
4.1c	-	-	-	390
4.1c	+	-	-	475
4.1c	-	+	-	758
4.1c	-	-	+	2 492
1.3c	+	-	-	1 035
1.3c	-	+	-	2 152
				5OS 7 695

Es ist aus Tabelle 7 zu erkennen, daß beide Säulenpräparationen sowohl das 1.3c als auch das 4.1c core aktivieren können. Da die zweite Präparation bessere Aktivität nach der Rekonstitution zeigt, wurde diese Säule für die nächsten Versuche eingesetzt.

m Experiment 1 der Tabelle 8 zeigt sich, daß die Fraktionen
3-44, 46-48, 49-51, 55-59 und 64-68 wichtig zu sein schei-
en, da das Weglassen dieser Fraktionen die Aktivität ver-
indert. Von ganz besonderer Wichtigkeit scheinen die Frak-
ionen 46-48 und 55-59 zu sein, da bei ihrem Fehlen die Akti-
ität stark herabgesetzt ist.

m Experiment 2 wird getestet, ob diejenigen Fraktionen, die
ls wichtig erkannt wurden, allein mit dem 4.1c core Aktivi-
ät zeigen, oder ob man die im Experiment 1 unwichtigen Frak-
ionen (33-37, 38-40, 41-42, 52-54, 60-63) nicht alle zusam-
en weglassen darf. Es zeigt sich, daß man die als unwichtig
rkannten Fraktionen nicht nur einzelnen, wie im Experiment 1,
ondern auch alle zusammen weglassen kann. Die beiden Frak-
ionen 46-48 und 55-59, die sich dadurch auszeichneten, daß
ei ihrem Fehlen die Aktivität stark absank, zeigen zusammen
it dem 4.1c core eine geringe, aber signifikante Aktivität.
xperiment 3 weist nach, daß das Weglassen der Fraktionen 43-44
nd 46-48 die Aktivität stark vermindert. Diese beiden Frak-
ionsgruppen sind auch allein in der Lage, das 4.1c core zu
eaktivieren (Experiment 4).

ie etwas unzulängliche Identifikation der in den Fraktionen
3-44 und 46-48 enthaltenen Proteine (Bestimmung nur durch
ie erste Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese)
urde wegen der beschränkten Proteinausbeute durchgeführt.
s wurden folgende Proteine identifiziert: L1, L5, L6, L11,
16, (L2, L10, L15). Die in Klammern angegebenen Proteine
aren schwach vorhanden. Das Experiment 5 der Tabelle 8 ist
m vergrößerten System ausgeführt worden; d.h. es wurden nicht
ie sonst 5.0 A_{260}-Einheiten vom 4.1c und die dafür optimale
enge Protein in Form von SP1.3 Säulenfraktionen zusammen pi-
ettiert, sondern es wurden 100 A_{260}-Einheiten 4.1c zusammen
it der entsprechenden Menge Protein (SP1.3 Säulenfraktionen
3-44 und 46-48) gemischt und unter Rekonstitutionsbedingungen
nkubiert. Anschließend wurde ein kleines Aliquot von 2 A_{260}-
inheiten im P.T.-Test untersucht, und es ergaben sich die in

Tabelle 8: Identifizierung der SP1.3 Säulenfraktionen wesentlich für Reaktivierung des 4.1c cores (partielle Rekonstitution)

core-Partikel	Proteine: Fraktionen der SP1.3 Säule											P.T Akt
	33-37	38-40	41-42	43-44	46-48	49-51	52-54	55-59	60-63	64-68	SP1.3	
4.1c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Experiment 1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 50S	1 6
4.1c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Exp. 2	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	
	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 50S	1 6
4.1c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Experiment 3	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	
	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	
	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	
	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	
	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 50S	1 4
4.1c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Exp. 4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 50S	2 5
4.1c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
											50S	5
	L2	L2 (L7/ L12)	L2 L1 (L7/ L12)	L1 L6 (L2)	L6,L5 L11 L16 (L10, L15)	L18 L10 L15 L16 (L11)	L15 L16 (L11)	L18 L24 (L15, L16)	L25	L27	Proteine der einzelnen SP Fraktionen. ( ) Protein schwach vorhanden	

der Tabelle 8 aufgezeichneten Werte. Aus diesen Werten geht hervor, wie auch schon im Experiment 4 gezeigt, daß diese 5 von insgesamt 35 Fraktionen der SP1.3 Säule allein in der Lage sind, mit dem 4.1c ein aktives P.T.-Zentrum aufzubauen.

Der Rest des Rekonstitutionsgemisches sollte dazu verwendet werden, die Proteine auf einer zweidimensionalen Gelelektrophorese zu identifizieren. Dies sollte eine nachträgliche Kontrolle für die Bestimmung der sich in den einzelnen Fraktionen befindlichen Proteine mit Hilfe der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese darstellen. Zu erwarten war, daß, wenn alle Proteine an die 4.1c Partikel binden, die Proteine L1, L5, L6, L11, L16 und (L2, L10, L15) zusammen mit dem 4.1c Proteinen auf der Gelplatte aufzufinden sind. Um die Proteine, die möglicherweise gar nicht an das 4.1c gebunden haben und damit auch nicht wichtig sind für die Knüpfung der Peptidbindung, vom Rekonstitutionspartikel zu trennen, haben wir das Rekonstitutionsgemisch für fünf Stunden bei 150 000 x g zentrifugiert. Dadurch sollen die Rekonstitutions-Partikel sedimentieren und von den nicht-gebundenen Proteinen getrennt werden. Nur das Sediment wurde genommen, um die Proteine auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu identifizieren. Dabei ergab es sich, daß von den anfangs 100 A_{260}-Einheiten Rekonstitutions-Partikel nach der Zentrifugation nur noch ungefähr 45 A_{260}-Einheiten zu finden waren, deren Proteine auf der anschließenden Gelelektrophorese ein sehr schwaches Proteinmuster ergaben. Es war uns möglich, die Proteine L1, L3, L4, L11, L13, L17, L20, L22 und L23 auf der Gelplatte zu identifizieren. Diese Proteine gehören offensichtlich zum engeren Kreis der P.T.-Anwärter. Man muß jedoch mit weiteren Proteinen rechnen, da schwach vorhandene Proteine auf dem 2D-Bild nicht zu erkennen waren.

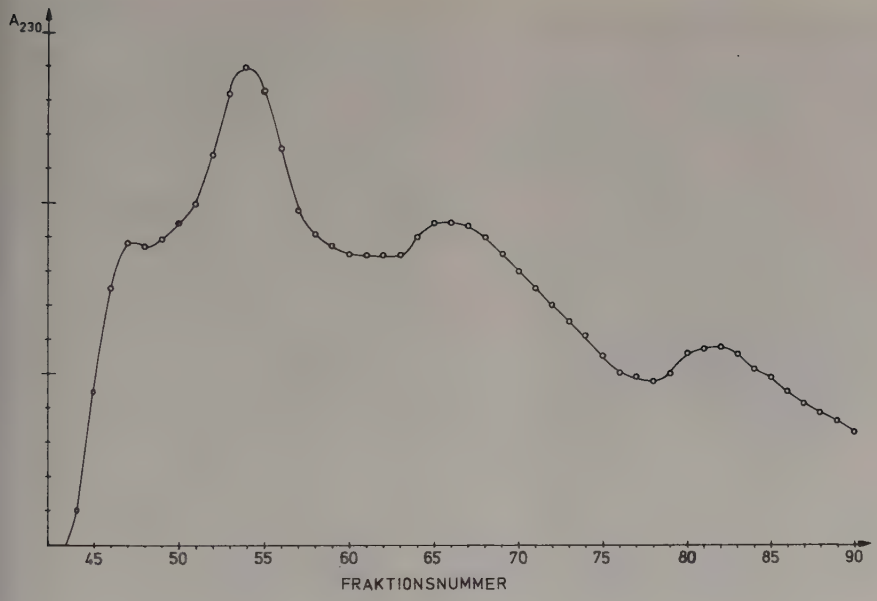
Da die Identifikation der Proteine in den vorangegangenen Experimenten nicht optimal war, wir aber andererseits auf eine möglichst genaue Aussage über die Proteine der SP1.3 split-

Protein Fraktion angewiesen waren, entschieden wir uns, eine weitere Säulentrennung der SP1.3 split-Proteine vorzunehmen. Ein weiterer Grund für die erneute Proteinreinigung war die nicht genügend große Ausbeute bei der ersten SP1.3 Säule. Die Identifizierung der Proteine in den einzelnen Fraktionen der zweiten Säule ist in Abbildung 3 dargestellt. Es wurden folgende Fraktionen der SP1.3 Säule ausgewählt, um eine grobe, vorläufige Aussage über die am P.T.-Zentrum beteiligten Proteine zu geben. In den ausgewählten acht Fraktionen waren die folgenden Proteine enthalten (identifiziert mittels 1D Elektrophorese):

Fraktion	Proteine
53	L1, L2, L6
63	L1, L6, L11, L15, L16, L18
69	L13, L15, L16, L18
79	L19, L24, L25, L28
85	L25, L27, L33
91	L33
98	L27, L30, L33
106	L30, L33

Um festzustellen, wie groß die benötigte Menge der einzelnen Fraktionen sein muß, damit unsere Rekonstitution mit 2.5 A_{260}-Einheiten optimal verlaufen kann, haben wir die einzelnen Fraktionen zusammengegeben und mit diesem Proteingemisch folgende Rekonstitution durchgeführt (siehe Tabelle 9).

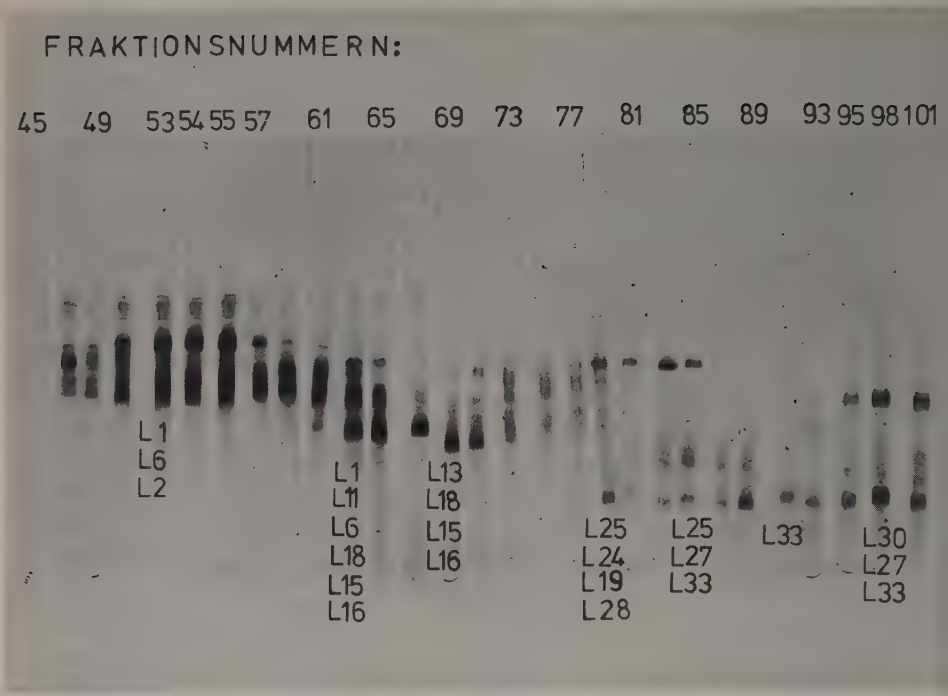
Abbildung 3



A: Elutionsprofil der SP1.3 split-Proteine aus einer Sephadex G100-Säule

50S Untereinheiten wurden mit 1.3 M LiCl gewaschen und durch anschließende Ultrazentrifugation sedimentiert (siehe 2.3.3). Die sich im Überstand befindenden Proteine (SP1.3 split-Proteine) wurden über eine Sephadex G100-Säule getrennt. Die Absorption bei 230 nm wurde gemessen und graphisch gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Eine detailliertere Beschreibung ist im Abschnitt 2.4.3 aufgeführt.

Abbildung 3



B: Ermittlung des Proteingehalts der einzelnen SP1.3 Säulen-Fraktionen durch die erste Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Ein Aliquot jeder zweiten Fraktion der SP1.3 Säulen Fraktionen wurde zur Proteinidentifikation entnommen und, wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben, mit der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese getestet. Die mit Amido-Schwarz gefärbten Gele wurden fotografiert. Die Proteine sind in der Reihenfolge ihres Auftretens von oben nach unten auf dem zugehörigen Gel bezeichnet worden.

Tabelle 9: Optimierung der einzusetzenden Proteinmenge der SP1.3 Säulenfraktionen

Rek. Nr.	core-Partikel	SP1.3 Proteingemisch aus den Fraktionen: 53, 63, 69, 79, 85, 91, 98, 106	TP50	SP1.3	P.T.-Aktivität [cpm]
1	4.2c	-	-	-	386
2		15 µl	-	-	457
3		30 µl	-	-	510
4		60 µl	-	-	741
5		120 µl	-	-	1 079
6		-	-	+	801
7		-	+	-	1 460
				LW	473
				50S	7 097

Es zeigt sich, daß bei dem Wert von 120 µl die acht Fraktionen der SP1.3 Säule gute Aktivität erreicht ist. Wir erhalten sogar einen etwas höheren Wert als in der Kontrollrekonstitution 6 mit den SP1.3 split-Proteinen. Deshalb haben wir in den weiteren Experimenten mit 15 µl als optimale Proteinmenge für jede einzelne Fraktion gearbeitet.

Im Experiment 1 der Tabelle 10 können wir feststellen, daß das Weglassen nur jeweils einer der ausgesuchten Fraktionen die Aktivität nicht auf den Leerwert bringt. Die stärksten Aktivitätseinbußen erfolgten beim Fehlen der Fraktion 63, 69, 98 oder 106. Aus diesem Grund wurden sie als relativ wichtig angesehen. Mit ihnen haben wir das Experiment 2 durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß nur die Kontrolle (Rekonstitution 7) aktiv war. Es ist also nicht möglich, mit den vier Fraktionen zusammen die P.T.-Aktivität aufrecht zu erhalten. Deshalb haben wir im Experiment 3 zuerst noch einmal die vier Fraktionen 63, 69, 98 und 106 und einmal die anderen vier Fraktionen 53, 79, 85 und 91 allein mit dem 4.2c rekonstituiert. Es wurde

Tabelle 10: Bestimmung der am P.T.-Zentrum beteiligten Proteine der SP1.3 split-Protein Säule

	Rek. Nr.	core	Fraktionen der SP1.3 Säule 53	63	69	79	85	91	98	106	TP50	P.T.-Aktivität [cpm]
Experiment 1	1	4.2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	141
	2		-	+	+	+	+	+	+	+	-	870
	3		+	-	+	+	+	+	+	+	-	650
	4		+	+	-	+	+	+	+	+	-	481
	5		+	+	+	-	+	+	+	+	-	996
	6		+	+	+	+	-	+	+	+	-	902
	7		+	+	+	+	+	-	+	+	-	908
	8		+	+	+	+	+	+	-	+	-	667
	9		+	+	+	+	+	+	+	-	-	815
	10		+	+	+	+	+	+	+	+	-	735
	11		-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 300
											LW	113
											50S	4 293
Experiment 2	1	4.2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	136
	2		-	-	+	-	-	-	+	+	-	142
	3		-	+	-	-	-	-	+	+	-	134
	4		-	+	+	-	-	-	-	+	-	159
	5		-	+	+	-	-	-	+	-	-	186
	6		-	+	+	-	-	-	+	+	-	188
	7		-	-	-	-	-	-	-	-	+	728
											LW	107
											50S	3 114
Experiment 3	1	4.2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	170
	2		-	+	+	-	-	-	+	+	-	198
	3		+	-	-	+	+	+	-	-	-	187
	4		+	-	-	+	+	+	+	+	-	202
	5		+	+	+	-	-	-	+	+	-	216
	6		-	+	+	+	-	-	+	+	-	313
	7		-	+	+	-	+	-	+	+	-	966
	8		-	+	+	-	-	+	+	+	-	325
	9		+	+	+	+	-	-	+	+	-	572
	10		+	+	+	-	+	-	+	+	-	949
	11		+	+	+	-	-	+	+	+	-	368
	12		-	+	+	+	+	-	+	+	-	829
	13		-	+	+	+	-	+	+	+	-	658
	14		-	+	+	-	+	+	+	+	-	746
	15		+	+	+	+	+	+	+	+	-	746
	16		-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 172
											LW	163
											50S	4 637
Experiment 4	1	4.2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	152
	2		-	-	+	-	+	-	+	+	-	498
	3		-	+	-	-	+	-	+	+	-	186
	4		-	+	+	-	-	-	+	+	-	187
	5		-	+	+	-	+	-	-	+	-	572
	6		-	+	+	-	+	-	+	-	-	813
	7		-	+	+	-	+	-	+	+	-	773
	8		-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 002
											LW	166
											50S	6 987

setzung Tabelle 10:.

core	Fraktionen der SP1.3 Säule 53	63	69	79	85	91	98	106	TP50	P.T.-Aktivität [cpm]
4.2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	199
	-	-	+	-	+	-	+	-	-	705
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	264
	-	+	+	-	-	-	+	-	-	229
	-	+	+	-	+	-	-	-	-	443
	-	+	+	-	+	-	+	-	-	1 098
	-	-	+	-	+	-	-	-	-	308
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 772
									LW	166
									50S	6 987

in beiden Fällen keine Aktivität gefunden. Dann haben wir in den Rekonstitutionen 4 bis 8 im Experiment 3 jeweils eine Fraktion zu den nicht aktiven vier Fraktionen 63, 69, 98 und 106 hinzugegeben und finden in der Rekonstitution 7 die höchste Aktivität, die sogar über der der Kontrollrekonstitution 15 liegt. Von diesen fünf Fraktionen können wir in unseren weiteren Experimenten ausgehen, womit wir die Fraktionen 53, 79 und 91 schon ausgeschlossen haben. Im Experiment 4 sind wir von diesen fünf Fraktionen ausgegangen und haben jeweils eine Fraktion weggelassen. Es zeigt sich, daß mit den vier Fraktionen 63, 69, 85 und 98 gleich viel Aktivität erzielt werden konnte, wie mit den fünf Fraktionen, von denen wir ausgingen; d.h. den vier genannten plus Fraktion 106. Aus diesem Grund versuchten wir im Experiment 5 die vier Fraktionen 63, 69, 85 und 98 weiter einzuschränken. Es ist festzustellen, daß allein mit den Fraktionen 69, 85 und 98 eindeutig signifikante Aktivität erzielt wurde. Die Aktivität beträgt etwa 30 % der Kontrollrekonstitution 8 des Experiments 5.
In den Fraktionen 69, 85 und 98 sind folgende Proteine enthalten: L13, L15, L16, L18, L25, L27, L30 und L33. Nimmt man Fraktion 63 hinzu, so steigt die Aktivität stark an, und es sind die Proteine L1, L6 und L11 zu den oben angegebenen acht Proteinen hinzuzuzählen.

3.5 Eine Partikel von Bacillus stearothermophilus 50S Ribosomen mit P.T.-Aktivität

Kontrollrekonstitutionen mit Bacillus stearothermophilus Komponenten führten zur Entdeckung einer Partikel mit P.T.-Aktivität. Dazu wurden Bacillus Zellen aufgebrochen, die Ribosomen aus dem Rohextrakt durch Zentrifugation isoliert und über Zonal-Zentrifugation aufgetrennt. Durch mehrmaliges Phenolisieren (siehe 2.5.1) wollten wir proteinfreie RNA von Bacillus stearothermophilus in Anlehnung an das Verfahren bei Escherichia coli gewinnen. Die durch Phenolisieren gewonnene Bacillus RNA wurde unter Rekonstitutionsbedingungen inkubiert und im P.T.-Test, der Fragment-Reaktion, untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 11 festgehalten.

Überraschenderweise zeigte es sich, daß Ph2RNA von Bacillus stearothermophilus allein, ohne weitere Addition von Proteinen, auch ohne Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen, signifikante P.T.-Aktivität zeigt, die durch Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen drastisch gesteigert wird. Das Kontrollexperiment mit dem E. coli 1.1c core und den SP1.1 split-Proteinen zeigt eine nur etwas bessere P.T.-Aktivität.

Die Proteinidentifizierung auf der Ph2RNA wurde mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese vorgenommen. Von allen Präparationen enthielt nur die Ph4RNA von Bacillus stearothermophilus keine Proteine. Selbst bei einer vierfachen Überladung der Elektrophorese (Ausgangsmenge 400 A_{260}-Einheiten Ph4RNA für die Essigsäureextraktion der Elektrophorese-Probe) konnte kein Protein auf der Gelplatte entdeckt werden. Mit der Ph3RNA war es wegen des schwachen Proteinmusters nicht möglich, die Flecken eindeutig den Proteinen der Bacillus 50S Untereinheit zuzuordnen. Dagegen fanden wir auf der Ph2RNA bei allen von uns durchgeführten Aufarbeitungen Bacillus 50S Proteine. Von Präparation zu Präparation gab es kleinere Abweichungen im Proteinmuster der Ph2RNA. Folgende Proteine der Bacillus 50S Untereinheit waren auf allen Präparationen der Ph2RNA zu fin-

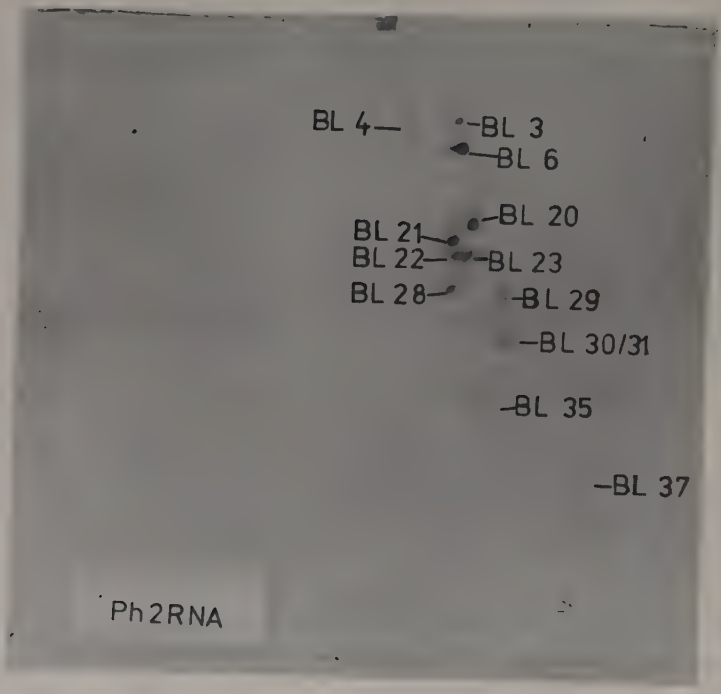
Tabelle 11: Test der phenolisierten Bacillus RNA auf P.T.-Aktivität

Bacillus RNA	E. coli 1.1c	E.coli SP1.1	Inkubationsbedingungen 90 Min/0°C	90 Min/50°C	P.T.-Aktivität cpm
Ph4RNA	-	-	+	-	147
Ph3RNA	-	-	+	-	164
Ph2RNA	-	-	+	-	380
Ph4RNA	-	-	-	+	175
Ph3RNA	-	-	-	+	209
Ph2RNA	-	-	-	+	1 158
-	+	-	-	+	247
-	+	+	-	+	1 620
				LW	180
				50S	4 070

(Ph2RNA = zweimal phenolisierte RNA, Ph3RNA = dreimal phenolisierte RNA, Ph4RNA = viermal phenolisierte RNA)

den (Nomenklatur der Bacillus stearothermophilus Proteine nach Horne und Erdmann, 1972): BL3, BL4, BL6, BL20, BL21, BL22, BL23, BL28 und BL29. Die Proteine BL2, BL12, BL17, BL18, BL30, BL31, BL35 und BL37 waren nur in einzelnen Aufarbeitungen zu entdecken, und dann auch nur schwach. Da alle Ph2RNAs aktiv waren, sollten unter den Proteinen BL3, BL4, BL6, BL20, BL21, BL22, BL23, BL28 und BL29 die Proteine zu finden sein, die für die Peptidknüpfung und damit für die P.T. im Bacillus Ribosomen verantwortlich und wichtig sind (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4



Proteinidentifizierung der Ph2RNA von Bacillus stearothermophilus mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Auf allen von uns präparierten Ph2RNAs waren die Proteine BL3, BL4, BL6, BL20, BL21, BL22, BL23, BL28 und BL29 zu finden. Die Nomenklatur der Bacillus stearothermophilus Proteine wurde von Horne und Erdmann (1972) übernommen. (Nähere Erläuterungen siehe Abschnitt 3.5)

3.6 Totale Rekonstitution des P.T.-Zentrums

Bisher waren wir in unseren Versuchen immer von einer Partikel ausgegangen, die aus RNA und Proteinen besteht. Wir wollen aber eine Partikel rekonstituieren, die aus möglichst wenigen Komponenten zusammengesetzt ist. Ob alle Proteine, die auf dem 4.Oc core gebunden sind, auch wirklich für die Aktivität von Wichtigkeit sind, läßt sich nur mit Hilfe von Total-Rekonstitutionsexperimenten entscheiden. Wir haben die RNA der 50S Untereinheit durch Phenolisieren isoliert (siehe 2.5.1). Die Proteine des 4.Oc wurden durch Essigsäureextraktion (siehe 2.4.1) gewonnen.

Nachdem wir beide Komponenten isoliert hatten, haben wir das zerlegte 4.Oc (RNA und 4.Oc HAc Proteine) mit den SP1.3 split-Proteinen unter Rekonstitutionsbedingungen inkubiert und anschließend im Fragment-Reaktionstest auf P.T.-Aktivität untersucht (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Totale Rekonstitution des E. coli Minimalsatzes ribosomaler Komponenten

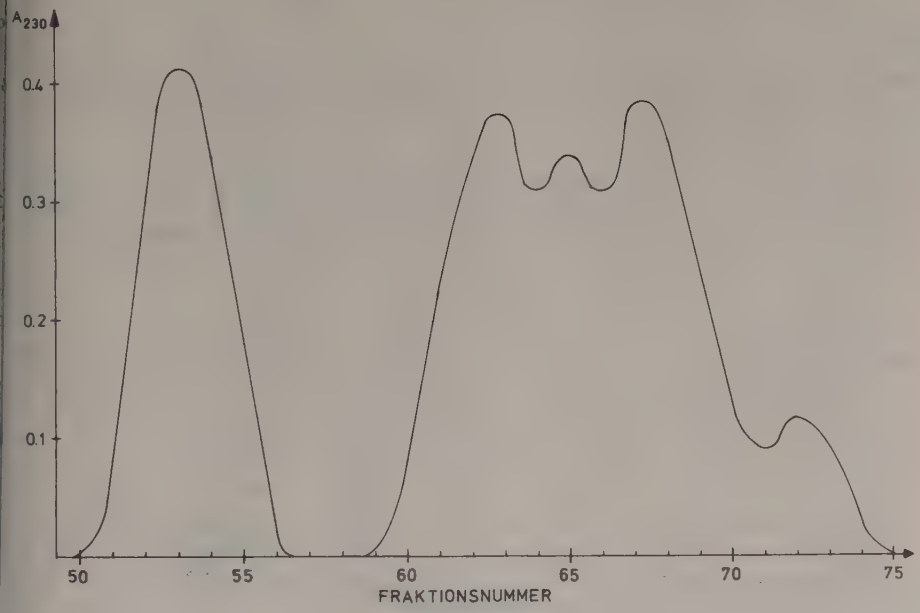
RNA 23S	RNA 5S	4.Oc HAc-Proteine	SP1.3 split-Proteine	P.T.-Aktivität [cpm]
+	-	-	-	478
+	-	-	+	488
+	+	-	+	473
+	-	+	+	572
+	+	+	+	1 762
4.Oc		-	+	3 093
			50S	8 457

Es zeigt sich (siehe Tabelle 12), daß man mit 23S und 5S RNA plus 4.0c HAc Proteinen und SP1.3 split-Proteinen eine Partikel erhält, die im Fragment-Reaktions-Test aktiv ist und damit die Fähigkeit aufweist, Peptidbindungen zu katalysieren. Mit diesem Versuch ist gleichzeitig gezeigt, daß es möglich ist, eine Partikel total zu rekonstituieren, die weniger als 34 Proteine hat und dennoch in der Lage ist, Peptidbindungen zu knüpfen.

3.6.1 Identifikation der für die P.T.-Aktivität wesentlichen Proteine des E. coli 4.3c cores

Wie schon in Tabelle 1 gezeigt, enthält das 4.0c core zwölf und das 4.3c core acht Proteine. Da beide Partikel nach der Rekonstitution mit SP1.3 Proteinen aktiv sind, beschränken wir uns bei der Analyse auf die acht Proteine der 4.3c Partikel (L3, L4, L13, L17, L20, L21, L22 und L23; siehe Tabelle 1). Mit den in Abbildung 5 gezeigten 4.3c core Fraktionen nach einer Sephadex G100 Gelfiltration versuchten wir, die Wichtigkeit der einzelnen Proteine für die P.T.-Aktivität zu bestimmen. Dazu inkubierten wir die von Proteinen freie RNA (5S und 23S RNA) mit den einzelnen 4.3c core Proteinen (Säulenfraktionen der 4.3c Säule) und den SP1.3 split-Proteinen unter Rekonstitutionsbedingungen und bestimmten anschließend die P.T.-Aktivität.

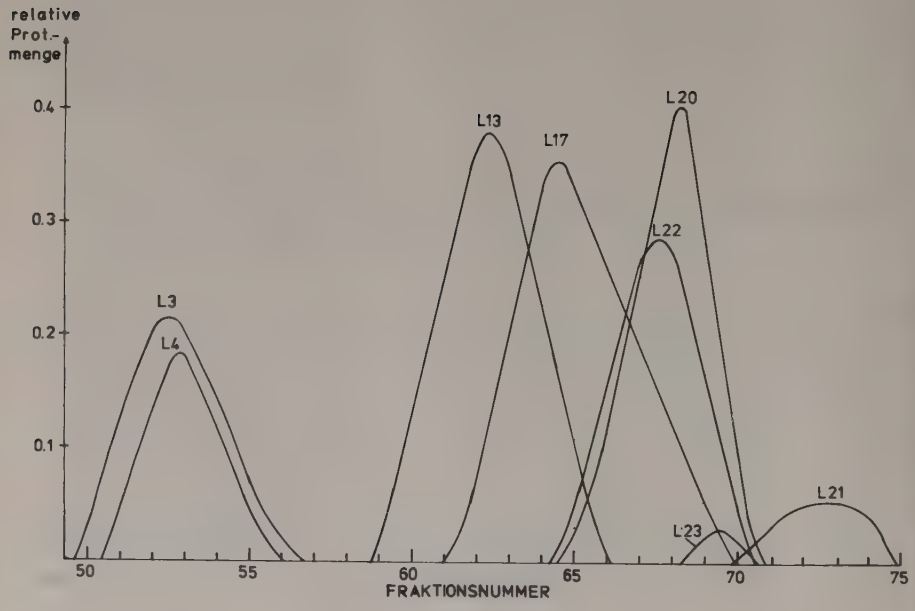
Abbildung 5



A: Elutionsprofil der 4.3c HAc Proteine aus einer Sephadex G100 Säule

50S Untereinheiten wurden mit 4.3 M LiCl gewaschen und durch anschließende Ultrazentrifugation sedimentiert (siehe 2.3.3). Die sich im Sediment befindenden Restkörper (4.3c core-Partikel) wurden durch Essigsäureextraktion von der RNA befreit (siehe 2.4.1), und die RNA-freien Proteine wurden über eine Sephadex G100-Säule getrennt (siehe 2.4.3). Die Absorption bei 230 nm wurde für jede Fraktion bestimmt und bei der graphischen Darstellung gegen die Fraktionsnummer aufgetragen.

Abbildung 5



B: Proteingehalt der einzelnen Fraktionen aus der 4.3c HAc-Protein Säule

Ein Aliquot jeder Fraktion der 4.3c HAc Protein Säule wurde zur Proteinidentifikation in der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese (siehe 2.4.2) getestet. Die Gele wurden mit Amido-Schwarz gefärbt. Die Intensität der Färbung ist ein Maß für die relative Proteinkonzentration, und sie wurde mit einem Joyce-Loebl Photometer bestimmt. Mit Hilfe eines Planimeters wurden die Kurven des Joyce-Loebl Photometers ausgewertet und die erhaltenen relativen Proteinkonzentrationen gegen die Fraktionen aufgezeichnet.

Tabelle 13: Bestimmung der für die P.T.-Aktivität wesentlichen Proteine des 4.3c cores (Totale Rekonstitution)

Zuordnung der Proteine:

Fraktion	Proteine
53:	L3+, L4+
61:	L13+
65:	L17+, L13(+), L20(+), L22(+)
69:	L20+, L22+, L17(+), L23(+)
73:	L21+

Der Proteingehalt wurde nach der 1. Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese bestimmt: + normale Proteinmenge
(+) verminderte Proteinmenge

	Rek. Nr.	RNA	4.3c HAc Proteine	Frakt. der 4.3c Säule 53	61	65	69	73	SP1.3	P.T.-Aktivität [cpm]
Experiment 1	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	361
	2		-	-	+	+	+	+	+	362
	3		-	+	-	+	+	+	+	3 152
	4		-	+	+	-	+	+	+	3 983
	5		-	+	+	+	-	+	+	2 401
	6		-	+	+	+	+	-	+	1 065
	7		-	+	+	+	+	+	+	3 531
	8		+	-	-	-	-	-	+	7 316
	9		-	+	-	-	-	-	+	452
	10		-	-	+	-	-	-	+	370
	11		-	-	-	+	-	-	+	366
	12		-	-	-	-	+	-	+	355
	13		-	-	-	-	-	+	+	450
									LW	400
									50S	13 073
Experiment 2	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	376
	2		-	+	-	-	-	-	+	408
	3		-	-	-	-	+	+	+	360
	4		-	+	-	-	+	-	+	502
	5		-	+	-	-	-	+	+	543
	6		-	+	-	-	+	+	+	898
	7		-	+	+	-	+	+	+	2 589
	8		-	+	+	+	+	+	+	2 056
	9		+	-	-	-	-	-	+	7 497
									LW	516
									50S	11 238
Experiment 3	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	420
	2		-	+	+	+	-	-	+	478
	3		-	+	+	-	+	-	+	805
	4		-	+	+	-	-	+	+	912
	5		-	+	-	+	+	-	+	787
	6		-	+	-	+	-	+	+	1 906
	7		-	+	-	-	+	+	+	888
	8		-	+	+	+	-	+	+	1 160
	9		-	+	-	+	+	+	+	1 310
	10		-	+	+	+	+	+	+	1 398
									LW	401
									50S	13 342

Im Experiment 1 (Tabelle 13) sind wir von der Summe aller 4.3c Fraktionen ausgegangen (Rekonstitution 7) und haben in den Rekonstitutionen 2 bis 6 jeweils eine Fraktion aus de Rekonstitutionsansatz herausgelassen. Es zeigt sich, daß die Proteine L3 und/oder L4 von hervorragender Wichtigkeit für die P.T.-Aktivität sind, weil ohne diese beiden Proteine (L3 und L4 in Fraktion 53) die Aktivität auf den Leerwert heruntersinkt (Rekonstitution 2). Das Fehlen von Protein L21 (Fraktion 73) führt zu einem starken Abfallen der P.T.-Aktivi tät (Rekonstitution 6), wodurch L21 als wichtiges Protein fü die Rekonstitution des P.T.-Zentrums angesehen werden muß.

Der Effekt, wenn eine der anderen Fraktionen (61, 65 oder 69 fehlt, gibt für die einzelnen Proteine dieser Fraktionen kei eindeutigen Aussagen, weil die darin enthaltenen Proteine mi der jeweiligen Nachbarfraktion überlappen. Als Ausnahme von diesen überlappenden Proteinen ist L23 zu nennen, das aber nu in ganz geringen Mengen auf dem 4.3c zu finden ist und nach der Säulentrennung in Fraktion 69 identifiziert wurde. Fehlt das Protein L23 (Fraktion 69) während der Rekonstitution, so eine fast normal gute P.T.-Aktivität festzustellen (Rekonsti- tution 5). Durch diesen Befund wird L23 als nicht wesentliche Protein bestimmt.

Das Protein L13 (Fraktionen 61 und 65) scheint ein wichtiges Protein zu sein, denn läßt man die L13-haltigen Fraktionen weg, so verringert sich die Aktivität drastisch, obwohl alle anderen Proteine des 4.3c im Rekonstitutionsansatz enthalten sind. Nur L17 ist in diesen Fällen vermindert vorhanden (Experiment 2, Rek. 6 und Experiment 3, Rek. 7).

Die Proteine L20 und/oder L22 (normale Proteinmenge in Fraktion 69 und verminderte Proteinmenge in Fraktion 65) scheinen ebenfalls von Bedeutung für das P.T.-Zentrum zu sein. Die beiden Proteine sind zu etwa gleichen Mengen in den Fraktione 65 und 69 enthalten; deswegen konnten wir sie nur gemeinsam als wichtig oder unwichtig charakterisieren. Lassen wir die

Hauptmenge der Proteine L20 und L22 (Fraktion 69) weg, so ist ein Abfallen der Aktivität zu beobachten. Die Aktivität sinkt nicht bis auf den Leerwert (Experiment 1, Rek. 5). Dies ist auch nicht zu erwarten; denn die Proteine L20 und L22 sind in verminderter Menge noch in der Fraktion 65 enthalten. Werden L20 und L22 ganz aus dem Rekonstitutionsansatz herausgelassen, so kommt es zu einer starken Verringerung der P.T.-Aktivität (Experiment 3, Rek. 4). Aus diesen Experimenten sehen wir L20 und L22 als wichtige Proteine des P.T.-Zentrums an.

Auch L17 ist aus dieser Rekonstitution als ein eventuell wichtiges Protein einzustufen, weil auch L17 nur in diesen beiden Fraktionen (65 und 69) vorkommt. Allerdings ist L17 stärker in Fraktion 65 und vermindert in Fraktion 69 enthalten. Lassen wir die Hauptmenge L17 (Fraktion 65) weg, so verringert sich die Aktivität nicht (Experiment 1, Rek. 4 und Experiment 2, Rek. 7). Wir können in den beiden Rekonstitutionen, in denen die Hauptmenge L17 fehlt, sogar ein leichtes Ansteigen der P.T.-Aktivität gegenüber den zugehörigen Kontrollrekonstitutionen beobachten (Experiment 1, Rek. 7 und Experiment 2, Rek. 8). Somit scheint das Protein L17 für die P.T.-Aktivität nicht wichtig zu sein.

Nehmen wir aber L3, L4 (Fraktion 53), die Hauptmenge L17 (Fraktion 65) und L21 (Fraktion 73), so finden wir eine eindeutig höhere Aktivität als in der zugehörigen Kontrollrekonstitution (vergleiche Experiment 3, Rek. 6 und Rek. 10).

Neben der Hauptmenge L17 enthält die Fraktion 65 noch die Proteine L20 und L22 in verminderter Menge. Wir können aus dem letzten Experiment schließen, daß L17 entweder doch eine wesentliche Funktion bei der Knüpfung der Peptidbindung hat, oder daß der Effekt den beiden in Fraktion 65 vermindert vorkommenden Proteinen L20 und L22 zuzuschreiben ist, die in der Kontrollrekonstitution (Experiment 3, Rek. 10) durch zweimalige Zugabe (Fraktionen 65 und 69 enthalten beide L20 und L22)

überoptimal vorliegen, wodurch ein Hemmeffekt auftreten könnte.

Zusammenfassend können wir sagen, daß durch die Experimente 1 bis 3 der Tabelle 13 folgende Aussagen möglich sind:

1. L3 und/oder L4 sind für das P.T.-Zentrum oder dessen Aufbau (assembly) "essential".
2. Die Proteine L13, L21 und L20 und/oder L22 scheinen "wichtig" zu sein.
3. Über L17 können wir keine eindeutige Aussage machen. Im Experiment 1 und 2 scheint es unwichtig zu sein, wogegen im Experiment 3 in Gegenwart von L17 die höchste Aktivität erzielt wurde.
4. L23 haben wir als "unwichtig" bestimmt.
5. Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit partiell gereinigten Proteinen gefunden. Es liegt auf der Hand, daß die Aussagen in Experimenten mit hochgereinigten Proteinen bestätigt werden müssen.

Abbildung 6

Nachweis der Reinheit der in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen Proteine.
A: Die essentiellen Proteine des P.T.-Zentrums

Es wurden jeweils zwei Gelplatten angefertigt. Auf der einen befanden sich 100 e.u. des sauberen Proteins und auf der anderen Gelplatte 100 e.u. des sauberen Proteins plus 20 e.u. TP50, um das zu identifizierende Protein zuordnen zu können.

Abbildung 6

Nachweis der Reinheit der in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen Proteine.
B: Die wichtigen Proteine des P.T.-Zentrums

Das "+"-Zeichen hinter den einzelnen Proteinangaben (z.B. L4+) gibt an, daß auf dieser Gelplatte zum sauberen Protein noch 20 e.u. von TP50 zugegeben wurden.

3.6.2 Rekonstitution mit sauberen und aktiven Proteinen der 50S Untereinheit des E. coli Ribosoms

3.6.2.1 Herstellung und Berechnung der einzusetzenden Proteine

Da die Aussage über die notwendigen Proteine des 4.3c cores und der SP1.3 split-Proteine nicht eindeutig ausfallen konnte, was durch Überschneidungen der in den Sephadex G100 Säulenfraktionen enthaltenen Proteinen bedingt ist, haben wir uns entschlossen, die Proteine durch eine von uns entwickelte Isoliermethode sauber und aktiv zu isolieren. Diese Isolierung wurde zusammen mit G. Wystup durchgeführt (siehe Dissertation G. Wystup, 1977). Es gelang, alle uns interessierenden Proteine der 50S Untereinheit von E. coli Ribosomen sauber voneinander getrennt zu isolieren (siehe Abbildung 6).
Um die isolierten Proteine in den richtigen Mengen zu unseren Rekonstitutionsansätzen hinzuzugeben, errechneten wir das theoretische Optimum für jedes Protein und für eine definierte RNA Menge von 2.5 A_{260}-Einheiten pro Rekonstitution. Zunächst wird die Molanzahl von 50S Untereinheiten errechnet, die in einer A_{260}-Einheit enthalten ist: das Molekulargewicht von 50S Untereinheiten ist 1.8×10^6:

(1) 1.8×10^6 g $\hat{=}$ 1 Mol 50S; ferner gilt die Beziehung

(2) $\frac{1}{16}$ mg $\hat{=}$ 1 A_{260}-Einheit; deshalb ist

1.8 mg $\hat{=}$ 10^{-9} Mol und

(3) $\frac{1}{16}$ mg $\hat{=}$ 3.47×10^{-11} Mol $\hat{=}$ 1 A_{260}-Einheit 50S Ribosomen

Proteinbestimmungen nach der Methode von Schaffner und Weismann (1973) mit TP50 in unserem Labor ergaben die Äquivalenz:

(4) 200 µg Protein $\hat{=}$ 1 A_{230}-Einheit. Für die Anzahl der Mole eines Proteins gilt dann:

$$\frac{2 \times 10^{-4}}{\text{MG des Proteins}} \text{ Mol } \hat{=} \text{ 1 } A_{230}\text{-Einheit}$$

Mit (3) lassen sich dann die Anzahl e.u. eines Proteins in einer A_{230}-Einheit berechnen.

(5) $\frac{2 \times 10^{-4}}{MG \times 3.47 \times 10^{-11}} \triangleq \frac{1}{MG \times 1.736} \times 10^{7}$ e.u. $\triangleq$ 1 A_{230}-Einheit

Wenn der A_{230}/ml Wert der Proteinlösung bekannt ist, läßt sich aus (5) die Anzahl der µl berechnen, die eine e.u. enthalten:

(6) $\frac{1000 \times 1.736 \times MG \times 10^{-7}}{A_{230}/ml} = \frac{1.736 \times MG \times 10^{-4}}{A_{230}/ml} \triangleq$ Anzahl µl,

die eine e.u. enthalten. In unseren Standardbedingungen unseres Rekonstitutionssystems werden 2.5 A_{230}-Einheiten RNA (23S + 5S) mit Proteinen inkubiert. Erfahrungsgemäß liegen die Proteinoptima bei ungefährt 3 e.u., d.h. aus (6) ergibt sich:

$$\frac{5.208 \times MG \times 10^{-4}}{A_{230}/ml}$$

(7) $$\simeq \frac{5 \times MG \times 10^{-4}}{A_{230}/ml} \triangleq \text{µl Anzahl, die 3 e.u.}$$

eines isolierten Proteins enthalten. Den Zähler nennen wir:

(8) $$y = 5 \times MG \times 10^{-4}$$

Die y-Werte für die 34 ribosomalen Proteine der großen Untereinheit von E. coli wurden bestimmt und in Tabelle 14 aufgelistet. Damit kann die Anzahl der µl, die 3 e.u. eines isolierten Proteins enthalten, mit (8) bestimmt werden zu $\frac{y}{A_{230}/ml}$.

Zur Überprüfung des theoretisch bestimmten Optimums haben wir das 1.3c core mit ansteigenden Mengen des Proteins L16 reaktiviert und dabei festgestellt, daß wir das experimentelle Optimum erhalten, wenn wir den theoretischen Wert mit dem Faktor 2.0-2.5 multiplizieren. Dieser Faktor gilt für alle 50S Proteine.

Tabelle 14: Berechnung der für die Rekonstitution benötigten Proteinmengen

$$\frac{y}{A_{230}/ml \text{ von Prot.}"x"} = \mu l \text{ mit 3 e.u. Protein}"x"$$

Protein	Molekulargewicht	y-Wert	
L1	27 000	13.5	
L2	31 500	15.7	
L3	27 000	13.5	
L4	26 000	13.0	
L5	22 000	12.0	
L6	22 000	12.0	
L7	13 000	6.5	(x3)
L8	17 000	8.5	
L9	17 000	8.5	
L10	19 000	9.5	
L11	19 000	9.5	
L12	13 000	6.5	(x3)
L13	18 000	9.0	
L14	16 000	8.0	
L15	18 000	9.0	
L16	21 000	10.5	
L17	17 000	8.5	
L18	14 000	7.0	
L19	15 000	7.5	
L20	17 000	8.5	
L21	14 000	7.0	
L22	15 000	7.5	
L23	13 000	6.5	
L24	14 000	7.0	
L25	12 000	6.0	
L26	12 000	6.0	
L27	12 000	6.0	
L28	12 000	6.0	
L29	9 000	4.5	
L30	11 000	5.5	
L31	10 000	5.0	
L32	10 000	5.0	
L33	10 000	5.0	
L34	9 600	4.5	

3.6.2.2 Analyse mit hochgereinigten Proteinen des 4.3c cores

Die sauber isolierten Proteine des 4.3c cores (L3, L4, L13, L17, L20, L21, L22 und L23) wurden zusammen mit der ribosomalen RNA (23S + 5S RNA) und den SP1.3 split-Proteinen unter den Bedingungen der zweistufigen Total-Rekonstitution (Nierhaus und Dohme, 1974) inkubiert, wobei die RNA und die Proteine des 4.3c cores im ersten Schritt (4 mM Mg^{++}, 44° C, 20 Minuten) und die SP1.3 split-Proteine zum zweiten Schritt (20 mM Mg^{++}, 50° C, 90 Minuten) dazugegeben wurden. Ein Aliquot des Rekonstitutionsansatzes wurde danach auf P.T.-Aktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

Es wurden alle Rekonstitutionen als Doppelbestimmungen ausgeführt. Experiment 1 der Tabelle 15 zeigt, daß die Proteine L3 und L20 auf keinen Fall im Rekonstitutionsmix fehlen dürfen, denn die P.T.-Aktivität bei den Rekonstitutionen 2 und 6 gehen auf den Leerwert zurück. Beim Fehlen des Proteins L4 (Rekonstitution 3) oder des Proteins L13 (Rek. 4) geht die Aktivität fast bis auf den Leerwert herunter. Die Proteine L17 (Exp. 1, Rek. 5), L21 (Rek. 7) und L22 (Rek. 8) gehören nicht zu den essentiellen Proteinen, da ihr Fehlen nur einen geringen Aktivitätsverlust verursacht, während das Protein L23 (Rek. 9) offensichtlich nicht dem P.T.-Zentrum zugeordnet werden kann, da sein Fehlen sich nicht in einem signifikanten Aktivitätsverlust äußert.

Im Experiment 2 haben wir bei allen Rekonstitutionen L23 weggelassen, weil wir im Experiment 1, Rek. 9 (ohne L23) höhere Aktivität fanden als in der Kontrollrekonstitution, in der L23 enthalten ist (Rek. 10). Die vier wichtigen Proteine (L3, L4, L13 und L20) des 4.3c cores, die wir im Experiment 1 festgestellt haben, wurden im Experiment 2, Rek. 2, allein mit der RNA und den SP1.3 split-Proteinen inkubiert und zeigten signifikante Aktivität.

Tabelle 15: Identifikation der wesentlichen 4.3c core Proteine

	Rek. Nr.	RNA	TP50	4.3c Proteine L3	L4	L13	L17	L20	L21	L22	L23	SP1.3	P.T.-Aktivität cpm
Experiment 1	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	969
	2		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	932
	3		-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1 045
	4		-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1 003
	5		-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1 788
	6		-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	936
	7		-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	1 568
	8		-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	2 060
	9		-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	2 207
	10		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1 880
	11		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4 082
												LW	810
												50S	16 383
Experiment 2	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	878
	2		-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	1 165
	3		-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	1 306
	4		-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	1 779
	5		-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	876
	6		-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	3 370
	7		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 385
												LW	832
												50S	15 847
Experiment 3	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 073
	2		-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	1 212
	3		-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	1 246
	4		-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	1 967
	5		-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	1 987
	6		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4 441
												LW	998
												50S	17 887
Experiment 4	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 282
	2		-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	1 276
	3		-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	1 339
	4		-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	1 326
	5		-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	1 242
	6		-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	1 379
	7		-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	1 648
	8		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 404
												LW	1 183
												50S	21 993

Die Zugabe von L22 (Rek. 3) zu den vier wichtigen Proteinen (L3, L4, L13, L20) und der RNA stimuliert etwas, wogegen die Zugabe von L21 und L22 eine hohe Aktivität ergibt. Somit ist es uns möglich gewesen, im Experiment 2 zu zeigen, daß man gute P.T.-Aktivität erzielen kann, wenn man L17 und L23 aus dem Rekonstitutionsansatz herausläßt. Die Rek. 5 im Experiment 2 wurde ausgeführt, weil wir die Möglichkeit einkalkulieren mußten (Tabelle 13, Experiment 3), daß L3, L4, L17 und L21 (Fraktion 53, 65 und 73) allein wesentlich sind, um hohe Aktivitäten mit der RNA und den SP1.3 split-Proteinen zu erzielen. Die im Experiment 3 der Tabelle 13 eingesetzte Fraktion 65 enthielt neben L17, das am stärksten vertreten war, noch die Proteine L13 und L20 sowie L22. Rek. 5 (Experiment 2 der Tabelle 15) zeigt keine Aktivität, d.h. L3, L4, L17 und L21 sind nicht allein in der Lage, mit SP1.3 und RNA ein P.T.-Zentrum zu rekonstituieren.

Im Experiment 3 der Tabelle 15 wollen wir zeigen, welche Proteine die geringe aber signifikante Aktivität der vier Proteine L3, L4, L13 und L20 stimulieren können. Die Zugabe von L17 (Exp. 3, Rek. 3) brachte keine Erhöhung der Aktivität, während L21 (Rek. 4) eine drastische Stimulation bewirkt. Das Experiment 3 der Tabelle 15 erlaubt somit die Aussage, daß die wichtigen Proteine des 4.3c cores die Proteine L3, L4, L13, L20 und L21 sind, die mit der ribosomalen 5S und 23S RNA und den SP1.3 split-Proteinen das P.T.-Zentrum rekonstituieren können.
Das Experiment 4 der Tabelle 15 bestätigt und erweitert das vorliegende Ergebnis. In diesem Experiment gehen wir von den wichtigen fünf Proteinen aus und lassen bei jeder Rekonstitution jeweils ein wichtiges Protein weg. Zusammen mit Experiment 1 können wir folgende Aussagen machen: Lassen wir das Protein L3 oder das Protein L20 weg, so finden wir mit den jeweils restlichen vier Proteinen keine Aktivität, d.h. die Proteine L3 und L20 sind essentiell. Dagegen finden wir ohne das Protein L4 eine Restaktivität, ebenso bei dem Fehlen des Proteins L13.

Wenn das Protein L21 fehlt, ist die Restaktivität noch etwas höher. Somit sind die Proteine L4, L13 und L21 als zwar wichtige, jedoch nicht essentielle Proteine zu bezeichnen.

3.6.2.3 Analyse mit hochgereinigten Proteinen der SP1.3 Fraktion

Mit den in Abschnitt 3.7.2 als wichtig identifizierten Proteinen des 4.3c cores und der ribosomalen RNA wollen wir die Proteine der SP1.3 split-Protein Fraktion auf die wichtigen Proteine reduzieren. Im Abschnitt 3.4 (der Tabelle 10) haben wir eine Vorklärung dieses Problems vorgenommen. Wir fanden, daß sich unter den Proteinen L1, L6, L11, L15, L16, L18, L25, L27, L30 und L33 die wichtigen Proteine befinden müssen. Die Rekonstitution in den folgenden Experimenten konnte nicht mit 2.5 A_{260}-Einheiten RNA (23S + 5S) in 100 µl durchgeführt werden, weil durch die Vielzahl der einzeln dazugegebenen Proteine das Volumen stark vergrößert werden mußte (auf 400 µl pro 2.5 A_{260}-Einheiten RNA). Das hatte zur Folge, daß die Rekonstitution suboptimal verlief und keine sehr hohen Aktivitäten erhalten wurden. Erst in den letzten Experimenten wurden die Werte deutlich besser, weil wir nach dem Ausschließen einiger Proteine das Gesamtvolumen verringern konnten

Die Proteine des 4.3c cores (L3, L4, L13, L20 und L21) wurden im 1. Schritt und die SP1.3 split-Proteine zum 2. Schritt der totalen Rekonstitution hinzugegeben.
Im Experiment 1 der Tabelle 16 wurden L1, L5, L6 und L10 auf ihre Wichtigkeit untersucht. Es zeigte sich, daß von diesen vier Proteinen das Fehlen von L1 die relativ stärkste Verminderung der P.T.-Aktivität hervorrief. Die Proteine L5, L6 und L10 wurden als unwesentlich erkannt und in dem nächsten Experiment fortgelassen. Die Rekonstitution 7 des Experimentes 1, bei der die vier Proteine (L1, L5, L6 und L10) gemeinsam weggelassen wurden, zeigte zu geringe Aktivität, um damit eine weitere Einschränkung vornehmen zu können.

Tabelle 16: Analyse der wesentlichen Proteine der SP1.3 split-Proteine für das P.T.-Zentrum

	Rek. Nr.	RNA	TP50	4.3c Prot. L3 L4 L13 L20 L21	L24	Homogene Proteine der SP1.3 split-Proteine L1	L2	L5	L6	L10	L11	L15	L16	L18	L25	L27	L30	L33	P.T.-Aktivität cpm
Experiment 1	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	775
	2		-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	929
	3		-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	951
	4		-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	976
	5		-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	963
	6		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	961
	7		-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	882
	8		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 953
																		LW	724
																		50S	19 976
Experiment 2	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	645
	2		-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	968
	3		-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1 104
	4		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	744
	5		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	859
	6		-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1 092
	7		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1 340
	8		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 017
																		LW	640
																		50S	17 702
Experiment 3	1	23S+5S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	784
	2		-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1 114
	3		-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	821
	4		-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	785
	5		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	867
	6		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	1 055
	7		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	1 387
	8		-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	1 397
	9		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 714
																		LW	816
																		50S	19 322

Die RNA, TP50, 4.3c Proteine und L24 wurden zum ersten Schritt und die homogenen Proteine des SP1.3 zum zweiten Schritt der zweistufigen Total-Rekonstitution (Nierhaus und Dohme, 1974) zugegeben.

Aus diesem Grund wurde das am stärksten die Aktivität vermindernde Protein L1 in das Experiment 2 mit aufgenommen. Mit der Rekonstitution 2 im Experiment 2 sollte noch einmal der Effekt von L1 gezeigt werden. Das Fehlen von L1 verringerte die P.T.-Aktivität deutlich. Das Protein L1 muß aus diesem Grund zu den stimulierenden Proteinen der P.T. zugezählt werden. In der Rekonstitution 3 wurde das Protein L11 untersucht, dessen Fehlen auch einen signifikanten Aktivitätsverlust hervorrief, womit auch dieses Protein L11 zu den stimulierenden Proteinen zu zählen ist. Die Proteine L18 (Rek. 4) und L27 (Rek. 5) haben einen größeren Einfluß als L11 auf die P.T.-Aktivität. Beide Proteine sind daher wichtig. Da ihr Fehlen die Aktivität allerdings nicht vollständig verschwinden läßt, kann man sie nicht als essentiell bezeichnen. Das Protein L24, daß bei dem Aufbau (assembly) der Ribosomen eine entscheidende Rolle spielt (Dohme, 1976), und aus diesem Grund zu den Rekonstitutionen zugegeben wurde, hat ebenfalls nur einen stimulierenden Effekt. Wenn L24 nicht in der Rekonstitution enthalten ist (Experiment 2, Rek. 6), verringert sich die Aktivität.

Experiment 3 der Tabelle 16 zeigt, daß bei dem Weglassen von L16 (Rek. 4) keine Aktivität und von L15 (Rek. 3) fast keine Aktivität gefunden wird. Wir schließen daraus, daß L16 und möglicherweise auch L15 zu den essentiellen Proteinen gehören, während wir L25 (Rek. 5) zu den wichtigen, aber nicht essentiellen Proteinen zählen. L2 (Rek. 2) und L30 (Rek. 6) vermindern durch ihr Fehlen deutlich die Aktivität, d.h. sie stimulieren die P.T.-Aktivität.

Abschließend möchten wir eine Zuordnung der Proteine in Abhängigkeit von der Wichtigkeit, mit der sie am P.T.-Zentrum beteiligt sind, aufstellen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Bedeutung ribosomaler Komponenten für das P.T.-Zentrum

essentiell	wichtig	stimulierend
L3	L4	L1
L15	L13	L2
L16	L18	L11
L20	L21	L17
23S RNA	L25	L22
	L27	L24
	5S RNA	L30

3.7 Die Bedeutung der RNA für die P.T.-Aktivität

Phenolisierte RNA der 50S Untereinheit wurde über eine Sephadex G100-Säule in 23S und 5S RNA getrennt (siehe 2.5.2). Dadurch wurden wir in die Lage versetzt zu testen, welche Bedeutung den beiden RNA Molekülen der 50S Untereinheit beim Aufbau des P.T.-Zentrums zukommt.

In Tabelle 18 in der zweiten Spalte ist unter der Bezeichnung "23S RNA" die über eine Sephadex G100-Säule hochgereinigte 23S RNA zu verstehen. In der dritten Spalte ist mit der Bezeichnung "23S + 5S RNA" ein nicht getrenntes Gemisch dieser beiden RNA Moleküle der 50S Untereinheit gemeint. Die Bezeichnung "18S RNA Fragment" der vierten Spalte meint ein Fragment der 23S RNA, das zwei Drittel der 23S RNA vom 3'-Ende her umfaßt (Spierer und Zimmermann, 1976). Dieses Fragment hat einen Sedimentationswert von 18S (siehe Abbildung 7 für weitere Information über das 18S-Fragment). In der fünften Spalte finden wir die Bezeichnung "5S RNA", die uns angibt, daß es sich um gereinigte 5S RNA handelt, die nicht mit 23S RNA verunreinigt ist. Die Protein Mixe, die in Spalte sechs und acht aufgelistet sind, geben uns den Minimalsatz ribosomaler Proteine an, die das P.T.-Zentrum bilden.

Wir haben im Versuch zur Tabelle 18 die in den Spalten zwei bis fünf aufgeführten RNAs auf die Fähigkeit hin untersucht, ob sie mit dem Minimalsatz ribosomaler Proteine oder aber mit den TP50 eine im Fragment-Reaktions-Test aktive Partikel rekonstituieren können.

belle 18: Einschränkung des RNA-Gehaltes für das Minicore

k.	23S RNA	23S + 5S RNA	18S RNA Fragment	5S RNA	Protein Mix 4.Oc L3,L4, L13,L20,L21	TP50	Protein Mix SP1.3 L1,L2, L11,L15,L16, L18,L25,L27, L30	P.T.-Aktivität [cpm]
	-	+	-	-	-	-	-	743
	+	-	-	+	-	-	-	749
	-	-	+	+	+	-	+	769
	+	-	-	-	+	-	+	912
	+	-	-	+	+	-	+	1 641
	-	+	-	-	+	-	+	1 665
	-	-	+	+	-	+	-	830
	+	-	-	-	-	+	-	1 233
	+	-	-	+	-	+	-	3 004
							LW	853
							50S	21 649

Wie aus Tabelle 18 hervorgeht, ist die 23S RNA sowohl mit den TP50 als auch mit dem Minimalsatz der ribosomalen Proteine fähig, eine signifikant aktive Partikel zu bilden (Rek. 8 und Rek. 4). Die Zugabe von 5S RNA zu diesen Rekonstitutionen steigert die Aktivität erheblich (Rek. 9 und Rek. 5). Damit zählt die 5S RNA zu den für die P.T.-Aktivität wichtigen Strukturelementen.

Gibt man die über eine Sephadex G100-Säule getrennten RNA Moleküle (23S und 5S) zusammen, und inkubiert man sie mit dem Minimalsatz ribosomaler Proteine, so erhält man die gleiche Aktivität, wie mit dem nicht getrennten RNA Gemisch, inkubiert mit diesen Proteinen (siehe Rek. 5 im Vergleich zu Rek. 6).

Es war nicht möglich, das 18S RNA Fragment zusammen mit 5S und TP50 oder den Minimalsatz ribosomaler Proteine zu einer aktiven Partikel zu rekonstituieren (siehe Rek. 3 und Rek. 7).

4 Diskussion

Mit "Peptidyltransferase" (E.C. 2.3.2.12; P.T., Monro (1967)) wird ein enzymatisches Zentrum auf der großen ribosomalen Untereinheit bezeichnet, welches die Peptidbindung zwischen Peptid und neu hinzukommendem Aminosäurerest knüpft. Es ist zweifelhaft, ob der Name Peptidyltransferase die enzymatische Aktivität zutreffend beschreibt, d.h., ob dieses Zentrum den Transfer der Polypeptidkette aktiv ausführt. Bislang gibt es keinen Beweis für die Annahme, daß die wachsende Peptidkette kovalent an eine den Transfer ausführende ribosomale Komponente gebunden ist.

Während der P.T.-Aktion wird die Esterbindung zwischen Peptidylrest und tRNA gespalten und in eine Peptidbindung zwischen Peptidylrest und Aminoacylrest überführt. Der $\Delta G^{O'}$-Wert der Esterbindung beträgt etwa -7 kcal per Mol, der entsprechende für die Peptidbindung -0.5 kcal per Mol. Dieser beträchtliche Energieabfall, der die Umformung der Esterbindung in die Peptidbindung begleitet, legt die Vermutung nahe, daß möglicherweise die Knüpfung der Peptidbindung spontan, d.h. ohne direkte Einwirkung des Ribosoms erfolgt, und daß sich somit die Funktion des P.T.-Zentrums auf eine subtile Ausrichtung von Peptidyl-tRNA und Aminoacyl-tRNA beschränkt. Experimentelle Untersuchungen über die Stabilität der Esterbindung widerlegen allerdings diese Vermutung.

So konnte gezeigt werden, daß die Esterbindung unter ungünstigen pH-Bedingungen (pH 9) bei 37^{O} C eine Halbwertzeit von etwa 30 Minuten besitzt. Physiologische pH-Bedingungen (um pH 7.5) verlängern die Halbwertzeit beträchtlich. Dieser lan-

gen Halbwertzeit steht eine hohe in vivo Aktivität des P.T.-Zentrums gegenüber, es werden etwa 20 Peptidbindungen pro Sekunde geknüpft. Daraus folgt, daß auch 20 Esterbindungen pro Sekunde geöffnet werden müssen. Damit ist zumindest für die Spaltung der Esterbindung eine aktive enzymatische Beteiligung des Ribosoms anzunehmen. Diese Spaltung der Esterbindung ist als Hydrolaseaktivität der entscheidende enzymatische Schritt bei der ribosomalen Termination. Es ist heute allgemein anerkannt, daß diese Hydrolaseaktivität ebenfalls vom P.T.-Zentrum ausgeführt wird.

Eine große Anzahl von Publikationen beschäftigt sich mit der Analyse dieses enzymatischen Zentrums. Mit unterschiedlichen Techniken ist eine große Zahl ribosomaler Komponenten identifiziert worden, die möglicherweise in dem P.T.-Zentrum zu lokalisieren sind. Tabelle 19 faßt die unterschiedlichen Befunde zusammen. Dreizehn bis vierzehn verschiedene Proteine sowie beide RNA-Moleküle der großen ribosomalen Untereinheit wurden als wichtig für die P.T.-Aktivität beschrieben. Komponenten, die mit verschiedenen Techniken und/oder von verschiedenen Autoren gefunden wurden, scheinen besonders gute Kandidaten für die P.T. zu sein. Dies gilt für die Proteine L2, L6, L11, L15, L16 und L27.

Zwei Methoden wurden besonders häufig angewendet: die (partielle) Rekonstitution und die Affinitätsmarkierung. Keine dieser beiden Methoden läßt eine eindeutige Aussage zu. Eine Komponente, die bei der partiellen Rekonstitution als wichtig gefunden wurde, kann das die Aktivität ausführende Element sein, es kann aber auch die aktive Konformation des enzymatischen Zentrums kontrollieren und damit nur indirekt an der enzymatischen Aktivität beteiligt sein. Bei der Affinitätsmarkierung muß zunächst der Nachweis geführt werden, daß die Markierung spezifisch ist, d.h., ob die Markierung mit der untersuchten Aktivität zusammenhängt. Ist dieser Nachweis erbracht, dann kann die markierte Komponente das aktive Ele-

ment sein, es kann aber auch eine dem enzymatischen Zentrum benachbarte Struktur sein, die möglicherweise nichts mit der Aktivität zu tun hat. Auch die in der Tabelle 19 jeweils nur einmal auftauchenden Techniken (Antikörper-Hemmung, Proteinmodifikation und Mutantenanalyse) können einer ähnlichen Kritik unterworfen werden und lassen keine eindeutigen Schlüsse zu. Es ist deshalb immer noch möglich, wenn auch wenig wahrscheinlich, daß keine der vorstehenden Techniken bis jetzt in der Lage war, die aktive Komponente zu erfassen.

Um dieser Vieldeutigkeit zu entgehen, und um die Aussage über an der P.T.-Aktivität beteiligten Komponenten zu schärfen, wandten wir eine neue experimentelle Strategie an. Schon frühere Experimente mittels der partiellen Rekonstitution (Nierhaus und Montejo, 1973) haben gezeigt, daß eine von der großen ribosomalen Untereinheit abgeleitete Partikel, der einige ribosomale Proteine fehlen, über ein voll aktives P.T.-Zentrum verfügt. Damit eröffnete sich die Möglichkeit, nach dem Minimalsatz ribosomaler Komponenten zu fragen, der ein aktives P.T.-Zentrum aufbauen kann.
Ribosomale Komponenten, die nicht in diesem Minimalsatz enthalten sind, können als P.T.-Anwärter ausgeschlossen werden. Die technische Voraussetzung für dieses Vorhaben schuf die Methode der totalen Rekonstitution aktiver 50S Untereinheiten (Nierhaus und Dohme, 1974). Wir gingen dabei von unserer Beobachtung aus, daß eine nur 10-12 Proteine enthaltende core-Partikel (4.0c-Partikel) mit einer etwa 15 Proteine enthaltenden split-Fraktion zu einem aktiven P.T.-Zentrum rekonstituiert werden konnte.

Eine erste Analyse wurde mit partiell gereinigten core- und split-Proteinen durchgeführt. Diese Befunde wurden mit nach einer neuen Methode hochgereinigten Proteinen bestätigt und erweitert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefaßt. Danach sind fünf ribosomale Komponenten, die vier Proteine L3, L15, L16 und L20 und 23S RNA, essentiell für die P.T.-Aktivität. Sieben Komponenten (die sechs Proteine L4, L13, L18,

belle 19: Komponenten des P.T.-Zentrums

50S oteine	Methoden der Identifikation: Affinitätsmarkierung	Rekonstitution	Andere Methoden
L 2	Sonnenberg et al,1973	Fahnestock,1975	-
	Oen et al,1973	-	-
	Sopori et al,1974	-	-
	Czernilofsky et al,1974	-	-
L 4	-	-	Wittmann et al,1973
L 6	Pongs,1974	Dietrich et al, 1974	-
L11	Hsiung et al,1974	Nierhaus und Montejo,1973	Tate et al,1975
L13	Czernilofsky et al,1974	-	-
L14	Oen et al,1973	-	-
L15	Czernilofsky et al,1974	-	Ballesta et al,1974
L16	Pongs et al,1973	Moore et al,1975	Tate et al,1975
	Nierhaus und Nierhaus, 1973	-	-
	Pellegrini,1973	-	-
	Czernilofsky et al,1974	-	-
L18	Hsiung et al,1974	-	-
L23	Cooperman et al,1975	-	-
L24	Eilat et al,1974	-	-
L27	Pellegrini et al,1972	-	-
	Sonnenberg et al,1973	-	-
	Oen et al,1973	-	-
	Sopori et al,1974	-	-
	Czernilofsky et al,1974	-	-
2/L33	Eilat et al,1974	-	-
S RNA	Barta et al,1975	-	-
S RNA	-	Erdmann et al,1971	-
	-	Dohme und Nierhaus, 1976	-

L21, L25, L27 und die 5S RNA sind wichtig für die P.T. Wird aus dieser Gruppe eine Komponente fortgelassen, so wird die Aktivität drastisch reduziert, erreicht jedoch nicht den Leerwert. Die sieben Proteine der dritten Gruppe (L1, L2, L11, L17, L22, L24 und L30) stimulieren schließlich die P.T.-Aktivität. Das Weglassen eines dieser Proteine reduziert die Aktivität, die mit allen Komponenten gefunden wird, um etwa 20 bis 40 %.

Eine mögliche Erklärung der Tatsache, daß wir mit dem 1.2c core plus dem sauberen Protein L11 eindeutige P.T.-Aktivität erhalten (Abschnitt 3.3, Tabelle 5), liegt darin, daß sich auf dem 1.2c core noch Spuren von L16 befanden. Nach diesem Befund kann man zwei Dinge aussagen. Erstens ist gezeigt, daß die Methode der partiellen Rekonstitution zu Zweideutigkeiten führen kann, wenn auf der core-Partikel noch Spuren eines Proteins enthalten sind, die auf der Platte der zweidimensionalen Gelelektrophorese als zu schwache Flecken nicht festgestellt werden können. Zweitens müßten wir nach diesem Befund das Protein L11 als ein wichtiges und nicht nur als ein stimulierendes Protein einstufen. Weitere Experimente müssen angestellt werden, um die Bedeutung von L11 bezüglich des P.T.-Zentrums (wichtig oder stimulierend) zu klären.

Vergleichen wir die Befunde der Tabelle 19 mit unseren Ergebnissen der Tabelle 17, so fällt auf, daß von den 17 am P.T.-Zentrum beteiligten Proteinen und den beiden RNA-Molekülen neun Proteine (L15, L16, L4, L13, L18, L27, L2, L11 und L24) sowie die 23S und 5S RNA übereinstimmend identifiziert worden sind. Die in der Literatur vertretene Annahme, daß L2 (Fahnestock, 1975) oder L11 (Nierhaus und Montejo, 1973) möglicherweise die P.T. darstellen, läßt sich auf Grund unserer Ergebnisse nicht aufrecht erhalten. Vier Proteine (L6, L14, L23, L32/L33), die mit der Affinitätsmarkierung bzw. der partiellen Rekonstitutionstechnik gefunden worden sind, gehören nicht zum P.T.-Zentrum und sind deshalb möglicherweise nur in

der Nachbarschaft dieses Zentrums lokalisiert.

Alle Proteine, die auf der 4.Oc-Partikel in stöchiometrischen Mengen gefunden werden (L3, L4, L13, L17, L20, L21 und L22) sind auch bedeutsam für das P.T.-Zentrum. Da das stufenweise Abwaschen ribosomaler Proteine durch steigende LiCl-Konzentrationen ungefähr die umgekehrte Reihenfolge widerspiegelt, mit der die ribosomalen Proteine in vivo (Nierhaus et al, 1973) und in vitro (Dohme und Nierhaus, 1976) die große ribosomale Untereinheit aufbauen, ist folgende Vermutung naheliegend: die 4.Oc Proteine stellen eine frühe Assembly-Stufe dar und bilden deshalb die strukturelle Grundlage für jede ribosomale Aktivität der großen Untereinheit. Diese Vermutung trifft aus folgenden Gründen sehr wahrscheinlich nicht zu. Erstens zeigen die 4.Oc Proteine eine verschiedene Bedeutung für das P.T.-Zentrum, L3 und L20 gehören zu den essentiellen Proteinen, L4, L13 und L21 zu den wichtigen und L17 und L22 zu den stimulierenden. Die Proteine, die für die erste Assembly-Stufe verantwortlich sind (L3, L4, L13, L20, L22 und L24; Spillmann, Dohme und Nierhaus, Manuskript in Vorbereitung) entsprechen nicht vollständig den 4.Oc-Proteinen und gehören auch nicht alle zu den für das P.T.-Zentrum essentiellen Proteinen. Wahrscheinlich entspricht das 4.Oc eher einer funktionell zusammengehörigen Gruppe von ribosomalen Komponenten als einer frühen Assembly-Stufe der großen ribosomalen Untereinheit.

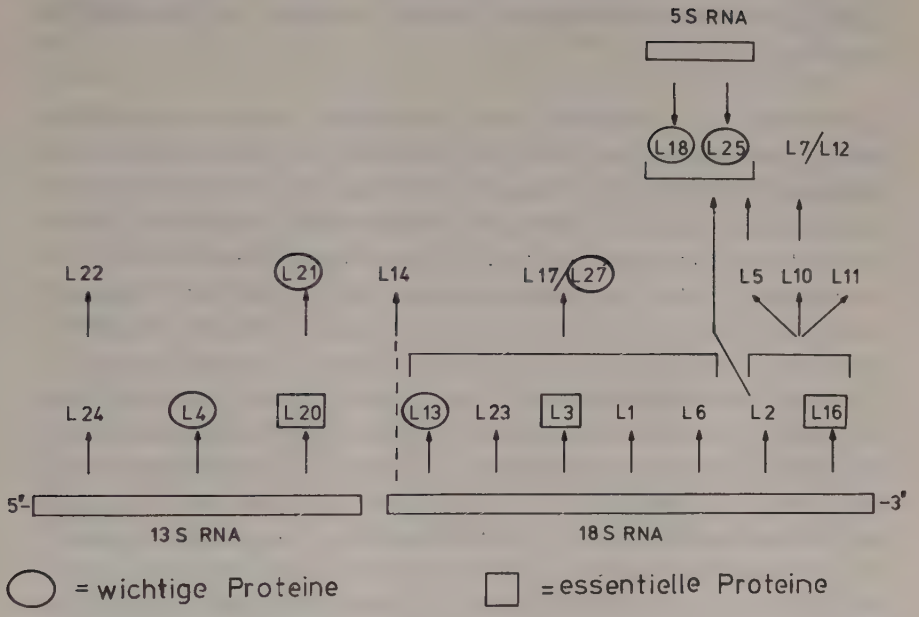
Man kann annehmen, daß die ribosomalen Komponenten, die die P.T. ausüben, "außen" liegen, d.h. zu denjenigen Proteinen zählen, die zuerst von Ribosomen abgewaschen werden beziehungsweise bei der Fragmentierung der Ribosomen mittels RNase zuerst verloren gehen. Folgen wir dieser Annahme und vergleichen die essentiellen und wichtigen Proteine mit denjenigen, die mit relativ geringen LiCl-Konzentrationen vom Ribosomen gewaschen werden können (Homann und Nierhaus, 1971) beziehungsweise mit denjenigen, die früh bei der RNase-Fragmentierung verloren gehen (Roth und Nierhaus, 1975), so erscheinen

die Proteine L16, L20, L18, L21, L25 und L27 als wahrscheinlichste Anwärter auf die P.T. Es soll jedoch betont werden, daß dies kein starkes Argument ist.

Die für das P.T.-Zentrum wichtigen ribosomalen Komponenten enthalten L18, L25 und 5S RNA, die (zusammen mit L5) den 5S-RNA-Komplex darstellen. Dieser Komplex zeigt eine faktorunabhängige GTP-ase und ATP-ase-Aktivität (Horne und Erdmann, 1973), die offensichtlich nichts mit der faktorabhängigen GTP-ase-Aktivität zu tun hat (siehe Übersicht Brimacombe et al, 1976) und deren Bedeutung zur Zeit noch unklar ist. Wird 23S RNA mit TP50 (und ohne 5S RNA) total rekonstituiert, so sind unter anderem auch die Proteine L18 und L25 signifikant vermindert (Dohme und Nierhaus, 1976). Diese rekonstituierte Partikel zeigt eine deutliche Aktivität für die tRNA-Bindung in die P-site, während keine Aktivität für die tRNA-Bindung in die A-site gefunden wird. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß der 5S RNA-Komplex eine wichtige Struktur der A-site Region des P.T.-Zentrums und der übrigen A-site als tRNA-Bindungsstelle darstellt (siehe Erdmann, 1976, für Einzelheiten).

Wir haben in einer weiteren Experimentalserie versucht, die essentielle Rolle der 23S RNA weiter einzuschränken. Von der 23S RNA können unter definierten Bedingungen der RNase-Verdauung zwei ungleich große Bruchstücke erhalten werden. Ein 5'-Fragment, das etwa ein Drittel der 23S RNA umfaßt (13S RNA), sowie das die restlichen zwei Drittel der 23S RNA ausmachende 3'Fragment (18S RNA). Durch Affinitätsmarkierung konnte Barta et al (1975) zeigen, daß eine 23S RNA-Region in der Nähe des 5'-Endes der 18S RNA ein Bestandteil der P-site Hälfte des P.T.-Zentrums ist oder zumindest in nächster Nachbarschaft liegt. Ferner macht Abbildung 7 deutlich, daß der größte Teil der für die P.T.-Aktivität wichtigen Proteine direkt oder indirekt an das 18S RNA-Fragment binden, wenn auch ein essentielles Protein, L20, der 13S RNA zuzuordnen ist.

Abbildung 7



Verteilung der Proteine auf das 13S RNA-Fragment und auf das 18S RNA-Fragment der 23S RNA

Die Abbildung 7 wurde von Spierer und Zimmermann (1976) übernommen. Es ist interessant, daß nur das Protein L20 von den essentiellen Proteinen und L4 und L21 von den wichtigen Proteinen auf dem 13S RNA-Fragment lokalisiert sind.

Wir untersuchten die Frage, ob möglicherweise die Proteine schon mit dem 18S Fragment ein aktives P.T.-Zentrum aufbauen können. Unsere Ergebnisse sind eindeutig (siehe Tabelle 18): Mit dem 18S RNA Fragment fanden wir keine Aktivität. Daraus folgt, daß für das P.T.-Zentrum nicht nur eine Region des 23S RNA Stranges wichtig ist, sondern offensichtlich eine definierte Tertiärstruktur des ganzen, intakten 23S RNA Stranges benötigt wird.

Die Erwartung, die wir an eine Analyse wie die vorliegende Arbeit knüpfen können, ist die, daß die untersuchte Aktivität alleine nur von einer Komponente abhängig ist. Das heißt, daß wir immer dann keine Aktivität finden, wenn diese eine Komponente fehlt, während das Fehlen jeder anderen Komponente sich höchstens in einer verminderten Aktivität ausdrückt. Diesen einfachen Fall finden wir bei der Analyse des P.T.-Zentrums nicht vor. Vielmehr ist eine größere Anzahl verschiedener ribosomaler Komponenten, allerdings mit jeweils verschiedener Wertigkeit, am Aufbau des P.T.-Zentrums beteiligt. Die aufwendige Struktur dieses Zentrums reflektiert die komplizierte Funktion, die neben der enzymatischen Aktivität der Knüpfung von Peptidbindungen auch in der subtilen Ausrichtung zweier großer Substrate (peptidyl-tRNA und aminoacyl-tRNA) liegt. Ferner ist es wahrscheinlich, daß einige ribosomale Komponenten den Aufbau (assembly) des P.T.-Zentrums ermöglichen, aber nicht direkt an der enzymatischen Aktivität beteiligt sind. Schließlich ist die große Zahl der stimulierenden Proteine ein Zeichen für die ausgesprochene Kooperativität einer quarternären Struktur, wie sie das Ribosomen darstellt. Hinweise für eine derartige Kooperativität wurden auch schon aus funktionellen Untersuchungen erhalten. So ist bekannt, daß die Beladung der P-site mit einer Peptidyl-tRNA die Aminoacyl-tRNA Bindung in die A-site stark stimuliert (Springer und Grunberg-Manago, 1972). Ferner stimuliert Chloramphenicol, ein für die A-site Hälfte des P.T.-Zentrums spezifisches Substrat, stark die Bindung von Fragmenten, die spezifisch in

die P-site dieses Zentrums binden (B. Ulbrich, 1976).

Die Frage nach den für das P.T.-Zentrum bedeutsamen Komponenten können wir aufgrund unserer Ergebnisse folgendermaßen beantworten: sind an dem Aufbau des P.T.-Zentrums mehrere Komponenten direkt beteiligt, so sind diese Komponenten unter den essentiellen und wichtigen Proteinen zu suchen. Ist jedoch nur eine ribosomale Komponente für die P.T.-Aktivität verantwortlich, so ist sie unter den fünf essentiellen Komponenten zu suchen. Sehr wahrscheinlich kommen in diesem Fall nur die vier ribosomalen Proteine in Betracht, und die 23S RNA scheidet aus, weil bis heute kein enzymatisches Zentrum bekannt ist, an dessen Aufbau eine Nukleinsäure direkt beteiligt ist, und es ferner nicht-ribosomale Proteine gibt, die außerhalb des Ribosoms Peptidbindungen knüpfen können (zum Beispiel Kleinkauf und Gevers, 1969).

Die vorgestellte experimentelle Strategie beantwortete die Frage nach dem P.T.-Zentrum umfassender und eingehender als die verschiedenen in Tabelle 19 zusammengefaßten Techniken. Trotzdem kann nur eine Teilantwort auf die Frage nach dem (beziehungsweise den) Peptidyltransferase-Protein(en) gegeben werden. Eine weitergehende Analyse ist nach dem Stand der heutigen ribosomalen Methodik nicht möglich. Erst ein Testsystem, das eine P.T.-Aktivität einer einzelnen ribosomalen Komponente nachweisen könnte, würde eine detaillierte Antwort geben können.

Zusammenfassung:

Mit der Methode der partiellen Rekonstitution war es möglich, das 4.0c core, das durch Inkubation von 50S Untereinheiten mit 4 M LiCl erhalten wurde, mit den SP1.3 split-Proteinen, die durch Inkubation mit 1.3 M LiCl erhalten wurden, zu einer aktiven Partikel zu rekonstituieren. Diese Rekonstitutionspartikel besteht aus etwa 25 ribosomalen Proteinen der 50S Untereinheit, die fast alle in voller Stärke vertreten sind.

Mit partiell gereinigten Proteinen, die über Sephadex G100-Säulen gewonnen wurden, war es möglich, die Zahl von 25 ribosomalen Proteinen, die durch Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen mit der 23S und 5S RNA Peptidyltransferase-Aktivität zeigten, sowohl im Bereich der SP1.3 split-Proteine als auch im Bereich der 4.0 HAc-Proteine einzuschränken. Vom 4.0c core waren die Fraktionen mit den Proteinen L3, L4, L13, L17, L20, L21 und L22 und von den SP1.3 split-Proteinen die Fraktionen mit den Proteinen L1, L6, L11, L15, L16, L18, L25, L27, L30 und L33 notwendig, um die Peptidyltransferase-Aktivität aufrecht zu erhalten.

Da bei den partiell gereinigten Proteinen eine eindeutige Aussage über die Beteiligung jedes einzelnen der 18 Proteine an der Peptidyltransferase nicht möglich war, haben wir alle für uns wichtigen Proteine hochgereinigt isoliert und anschließend mit der Methode der totalen Rekonstitution auf ihre Wichtigkeit für die Peptidyltransferase-Aktivität hin getestet. Dies führte zu einer Bestätigung beziehungsweise Einschränkung der mit partiell gereinigten Proteinen erhaltenen Ergebnisse. Nur vier Proteine (L3, L15, L16 und L20) wurden als "essentiell" für die Peptidyltransferase identifiziert. Sechs weitere Proteine (L4, L13, L18, L21, L25 und L27) wurden als "wichtig" erkannt.

Wenn das enzymatische Zentrum, das die Knüpfung der Peptidbindung katalysiert, nur aus einem Protein besteht, so muß sich dieses Protein unter den "essentiellen" Proteinen befin-

den. Handelt es sich bei der Peptidyltransferase um ein Zusammenspiel verschiedener ribosomaler Proteine, so gehören diese Proteine zu den "essentiellen" und den "wichtigen" Proteinen.

Die Bedeutung der ribosomalen RNA (5S und 23S RNA) für die Peptidyltransferase wurde ebenfalls untersucht. Dabei haben wir festgestellt, daß die 23S RNA "essentiell" und die 5S RNA "wichtig" ist. Außerdem konnten wir zeigen, daß ein 18S RNA-Fragment, das zwei Drittel des 23S RNA-Moleküls einschließlich des 3'Endes umfaßt, nach Inkubation unter Rekonstitutionsbedingungen mit den Proteinen des Peptidyltransferase-Zentrums und der 5S RNA zu keiner Peptidyltransferase-Aktivität führt.

LITERATURVERZEICHNIS

Ballesta, J.P.G., V. Montejo, F. Hernandez & D. Vazquez (1974) "Ateration of Ribosomal Proteins and Functions by 2-Methoxy-5-nitrotropone", Eur. J. Biochem. 42, 167-175.

Baltimore, D. (1970), "Viral RNA-dependent DNA Polymerase", Nature 226, 1209-1211.

Barta, A., E. Küchler, C. Branlant, J. Sri Widada, A. Krol & J.P. Ebel (1975), "Photoaffinity labeling of 23S RNA at the donor-site of the Escherichia coli ribosomes", FEBS Letters 56, 170-174.

Branlant, C., J. Sri Widada, A. Krol, P. Fellner & J.P. Ebel (1975), "Nucleotide sequence of the T_1 and pancreatic ribonuclease digestion products from the large fragments of the 23S RNA of Escherichia coli", Biochimie 57, 175-225.

Brimacombe, R., K.H. Nierhaus, R.A. Garrett & H.G. Wittmann (1976), "The Ribosome of Escherichia coli", Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 18, 1-44.

Brownlee, G.G., F. Sanger & B.G. Barrell (1968), "The Sequence of 5S Ribosomal Ribonucleic Acid", J. Mol. Biol. 34, 379-412.

Cantor, C.R., M. Pellegrini & H. Oen (1974), "Affinity Labeling Techniques for Examining Functional Sites of Ribosomes", Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series 573-585.

Ceri, F.K. & P.Y. Maeba (1973), "Association of a Ribonuclease with the 50S Ribosomal Subunit of Escherichia coli MRE 600", Biochim. Biophys. Acta 312, 337-348.

Cooperman, B.S., E.N. Jaynes, D.J. Brunswick & M.A. Luddy (1975), "Photoincorporation of puromycin and N-(ethyl-2-diazo-malonyl) puromycin into Escherichia coli Ribosomes", Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 2974- 2978.

Crick, F.H.C. (1958), "On Protein Synthesis", Symp. Soc. Exptl. Biol. 12, 138-163.

Czernilofsky, A.P., E.E. Collatz, G. Stöffler & E. Küchler (1974), "Proteins at the tRNA Binding Sites of Escherichia coli Ribosomes", Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 230-234.

Dietrich, S., I. Schrandt & K.H. Nierhaus (1974), "Interdependence of E. coli Ribosomal Proteins at the Peptidyltransferase Centre", FEBS Letters 47, 136-139.

Dohme, F. (1976), "Totale Rekonstitution der 50S Untereinheiten von Escherichia coli Ribosomen", Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie.

Dohme, F. & K.H. Nierhaus (1976), "Role of 5S RNA in assembly and function of the 50S subunit from Escherichia coli" Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2221-2225.

Eilat, D., M.Pellegrini, H. Oen, Y. Lapidot & C.R. Cantor (1974) "A Chemical Mapping Technique for Exploring the Location of Proteins along the Ribosome-bound Peptide Chain", J. Mol. Biol. 88, 831-840

Ehresmann, C., P. Stiegler, P. Fellner & J.P. Ebel (1972), "The Determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli. (2) Nucleotide sequences of products from partial enzymatic hydrolysis", Biochimie 54, 901-967.

Ehresmann, C., P. Stiegler, C.A. Mackie, R.A. Zimmermann, J.P. Ebel & P. Fellner (1975), "Primary sequence of the 16S Ribosomal RNA of Escherichia coli", Nucl. Acid Research 2, 265- 302

Erdmann, V.A. (1976), "Structure and Function of 5S and 5.8S RNA", Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 18, 45-90

Erdmann, V.A., S. Fahnestock, K. Higo & M. Nomura (1971), "Role of 5S RNA in the function of 50S ribosomal subunit", Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2932-2936.

Expert-Besançon, A., M.F. Guerin, D.H. Hayes, L. Legault & J. Thibault (1974), "Preparation of E. coli ribosomal subunits without loss of biological activity", Biochimie 56, 77-89.

Fahnestock, S.R. (1975), "Evidence of the Involvement of a 50S Ribosomal Protein in several Avtive Sites", Biochemistry 14, 5321-5327.

Fellner, P. (1974), "Structure of the 16S and 23S Ribosomal RNAs", Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series 169-191.

Gesteland, R.F. (1966), "Isolation and Characterisation of Ribonuclease 1 Mutants of Escherichia coli", J. Mol. Biol. 16, 67-84.

Ghosh, H.P., D. Söll & H.G. Khorana (1967), "Studies on Polynucleotides", J. Mol. Biol. 25, 275-298.

Green, M. & G.F. Gerard (1974), "RNA-Directed DNA Polymerase-Properties and Functions in Oncogenic RNA Viruses and Cells", Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 14, 187-334.

Hardy, S.J.S., C.G. Kurland, P. Voynow & G. Mora (1969), "The Ribosomal Proteins of Escherichia coli. 1. Purification of the 30S ribosomal Proteins", Biochemistry 8, 2897-2905.

Hindennach, I., E. Kaltschmidt & H.G. Wittmann (1971), "Ribosomal Proteins. Isolation of Proteins from 50S Ribosomal Subunits of Escherichia coli", Eur. J. Biochem 23, 12-16.

Homann, H.E. & K.H. Nierhaus (1971), "Ribosomal Proteins. Protein Compositions of Biosynthetic Precursors and Artifical Subparticles from Ribosomal Subunits in Escherichia coli K12", Eur. J. Biochem. 20, 249-257.

Horne, J.R. & V.A. Erdmann (1972), "Isolation and Characterisation of 5S RNA-Protein Complexes from Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli Ribosomes", Mol. Gen. Genet. 119, 337-344.

Horne, J.R. & V.A. Erdmann (1973), "ATPase and GTPase Activities Associated with a Specific 5S RNA-Protein Complex" Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2870-2873.

Hsiung, N., S.A. Reines & C.R. Cantor (1974), "Investigation of the Ribosomal Peptidyl Transferase Centre Using a Photoaffinity Label", J. Mol. Biol. 88, 841-855.

Kaltschmidt, E. & H.G. Wittmann (1970), "Ribosomal Proteins. VII. Two-Dimentional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins", Anal. Biochem. 36, 401- 412.

Kleinkauf, H. & W. Gevers (1969), "Nonribosomal Polypeptide Synthesis: The Biosynthesis of a Cyclic Peptide Antibiotic, Gramicidin S", Symposia on Quantitative Biology 34, 805-813.

Monro, R.E. (1967), "Catalysis of peptide bond formation by 50S ribosomal subunits from E. coli", J. Mol. Biol. 26, 147-151.

Monro, R.E. (1971), "Ribosomal Peptidyltransferase: The Fragment Reaction", Methods in Enzymology 20, 472-481.

Monro, R.E., T. Staehelin. M.L. Celma & D. Vazquez (1969),"The peptidyl transferase activity of ribosomes", Symposia on Quantitative Biology 34, 357-368.

Moore, V.G., R.E. Atchison, G.Thomas, M. Moran & H.F. Noller (1975), "Identification of a Ribosomal Protein essential for Peptidyl Transferase Activity", Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 844-848.

Morgan, J. & R. Brimacombe (1972), "A Series of Specific Ribonucleoprotein Fragments from the 30S Subparticle of Escherichia coli Ribosomes", Eur. J. Biochem. 29, 542-552.

Nierhaus, K.H., K. Bordasch & H.E. Homann (1973), "Ribosomal Proteins: XLIII. In vivo Assembly of Escherichia coli Ribosomal Proteins", J. Mol. Biol. 74, 587-597.

Nierhaus, K.H. & F. Dohme (1974), "Total Reconstitution of a Functionally Active 50S Ribosomal Subunit from Escherichia coli", Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4713-4717.

Nierhaus, K.H. & V. Montejo (1973), "A Protein Involved in the Peptidyltransferase Activity of Escherichia coli Ribosomes", Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1931-1935.

Nierhaus, D. & K.H. Nierhaus (1973), "Identification of the Chloramphenicol-Binding Protein in Escherichia coli Ribosomes by the Partial Reconstitution", Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2224-2228.

Oen, H., M. Pellegrini, D. Eilat & C.R. Cantor (1973), "Identivication of 50S Proteins at the Peptidyl-tRNA Binding Site of Escherichia coli Ribosomes", Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2799-2803.

Pellegrini, M. (1973), "Affinity Label studies with Bacterial Ribosomes", Ph. D. Dissertation, Columbia University, New York.

Pellegrini, M., H. Oen & C.R. Cantor (1972), "Covalent Attachment of a Peptidyl-Transfer RNA Analog to the 50S Subunit of Escherichia coli Ribosomes", Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 837-841.

Pongs, O. (1974), "Affinity labeling of the peptidyltransferase centre of E. coli ribosomes", Acta Biol. Med. Germ. 33, 629-633.

Pongs, O., R. Bald & V.A. Erdmann (1973), "Irreversible binding of N-iodoacetyl-puromycin to E. coli ribosomes", FEBS Letters 35, 137-140.

Pongs, O., K.H. Nierhaus, V.A. Erdmann & H.G. Wittmann (1974), "Active Sites In Escherichia coli Ribosomes", FEBS Letters 40, 28-37.

Roth, H.E. & K.H. Nierhaus (1973), "Isolation of Four Ribonucleoprotein Fragments from the 30S Subunit of E. coli Ribosomes", FEBS Letters 31, 35-38.

Roth, H.E. &K.H. Nierhaus (1975), "Structural and Functional Studies of Ribonucleoprotein Fragments Isolated from Escherichia coli 50S Ribosomal Subunits", J. Mol. Biol. 94, 111-121.

Schaffner, W. & C. Weissmann (1973), "A Rapid, Sensitiv, and Specific Method for the Determination of Protein in Dilute Solution", Anal. Biochem. 56, 502-514.

Sonnenberg, N., M. Wilchek & A. Zamir (1973), "Mapping of Escherichia coli Ribosomal Components Involved in Peptidyl Transferase Activity", Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1423-1426.

Sopori, M., M. Pellegrini, P. Lengyel & C.R. Cantor (1974), "Affinity Labeling of Escherichia coli Ribosomal Proteins with an Analog of the Natural Initiator tRNA", Biochemistry 13, 5432-5439.

Spierer, P. & R.A. Zimmermann (1976), "RNA-Protein Interactions in the Ribosome", J. Mol. Biol. 103, 647-653.

Springer, M. & Grunberg-Manago (1972), "Characteristics of N-ac-phe-tRNA binding and its correlation with internal aminoacyl-tRNA recognition", Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 743-750.

Staehelin, T., D. Maglott & R.E. Monro (1969), "On the Catalytic Centre of the Peptidyl Transfer: A Part of the 50S Ribosome Structure", Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 36, 39-48.

Stöffler, G., L. Daya, K.H. Rak & R.A. Garrett (1971), "Ribosomal Proteins. Specific Protein Binding Sites on 23S RNA of Escherichia coli", Mol. Gen. Genet. 114, 125-133.

Tate, W. P., C.T. Caskey & G. Stöffler (1975), "Inhibition of Peptide Chain Termination by Antibodies Specific for Ribosomal Proteins", J. Mol. Biol. 93, 375-389.

Temin, H.M. & S. Mizutani (1970), "RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus", Nature 226, 1211-1213.

Traub, P. & M. Nomura (1968), "Structure and Function of E. coli Ribosomes. V. Reconstitution of Functionally Active 30S Ribosomal Particles from RNA and Proteins", Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 777-784.

Ulbrich, B. (1976), "Neue Methoden zum Studium der tRNS Bindung und einiger Aktivitäten des Peptidyltransferase-Zentrums in Escherichia coli Ribosomen" Dissertation , Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie.

Vazquez, D. (1974), "Inhibitors of Protein Synthesis", FEBS Letters 40, 63-84.

Wittmann, H.G. (1974), "Purification and Identification of Escherichia coli Ribosomal Proteins", Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series 94-114.

Wittmann, H.G., G. Stöffler, D. Apirion, L. Rosen, K. Tanaka, M. Tamaki, S. Dekio, E. Otaka & S. Osawa (1973), "Biochemical and Genetic Studies on Two Different Types of Erythromycin Resistant Mutants of Escherichia coli with Altered Ribosomal Proteins", Mol. Gen. Genet. 127, 175-189.

Wittmann, H.G. & B. Wittmann-Liebold (1974), "Chemical Structures of Bacterial Ribosomal Proteins", Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series 115-140.

Wystup, G. (1977), Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie.

LEBENSLAUF

Name, Vorname:	Hampl, Hartmut
geboren am:	27. Mai 1947
in:	Berlin
Schulausbildung:	Grundschule von 1954 bis 1960 in Berlin Goethe-Gymnasium, Math.- Naturw.-Zweig, von 1960 bis 1968 in Berlin Reifeprüfung im April 1968
Studium:	Sommersemester 1968 bis Sommersemester 1970 Studium der Biologie an der F. U. Berlin. Mai 1970 Vordiplom-Prüfung in Biologie. Wintersemester 1970/71 bis Wintersemester 1972/73 Studium der Mikrobiologie an der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen. Februar 1973 mündliche Diplomhauptprüfung in Mikrobiologie (Nebenfächer: Humangenetik, Biochemie und Pflanzenphysiologie) Ab Mai 1973 arbeite ich am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE GENETIK, ABTEILUNG WITTMANN in Berlin-Dahlem auf dem Gebiet der Proteinbiosynthese. Ich möchte mein Studium mit der Promotion abschließen.

Für die stete Bereitschaft zur Diskussion und freundschaftliche Ermutigung bin ich Herrn Dr. K.H. Nierhaus zu großem Dank verpflichtet.